



Persistence et adaptation de *Listeria monocytogenes* dans le sol : rôle du système de communication Agr

Anne-Laure Vivant

► To cite this version:

Anne-Laure Vivant. Persistence et adaptation de *Listeria monocytogenes* dans le sol : rôle du système de communication Agr. Ecologie, Environnement. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS083 . tel-01381157

HAL Id: tel-01381157

<https://theses.hal.science/tel-01381157>

Submitted on 14 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche



Université de Bourgogne - INRA
Unité Mixte de Recherche 1347 Agroécologie
Ecole Doctorale Environnements – Santé

THESE

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline Sciences de la Vie, Spécialité Ecologie Microbienne

Persistance et adaptation de *Listeria monocytogenes* dans le sol : rôle du système de communication Agr

Présentée et soutenue par

Anne-Laure Vivant

le 09/07/2014

Composition du jury

Loïc Bollache, Président de jury

Michel Gohar, Rapporteur

Anne-Marie Pourcher, Rapporteur

Romain Briandet, Examineur

Pascal Piveteau, Directeur de thèse

Dominique Garmyn, Co-encadrant

A word cloud visualization of research topics related to *Monocytogenes*. The words are arranged in a horizontal, cloud-like shape against a black background. The colors of the words range from light green to yellow, with some words in red. The size of the words indicates their frequency or importance in the dataset.

monocytogenes

environnement

communication

régulation

sol

transcriptionnel

invasion

cellules AIP

virulence

populations

expression

régulateur

composants

adaptation

complexe

Agr

histidine

autonducteur

kinase

gènes

agrA

biofilm

études

littérature

infection

agrD

adherence

mutant

biotique

coloniser

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Philippe Lemenceau pour son accueil au sein de l'UMR Agroécologie. Je tiens aussi à remercier Alain Hartmann pour son accueil au sein du Pôle MERS.



Un grand merci à Pascal Piveteau, mon encadrant, qui a tout d'abord accepté de me confier ce sujet des plus intéressants, mais surtout pour tout l'investissement qu'il y a mis, tous les conseils, le calme et la sérénité qu'il m'a apportés.

Mes remerciements vont à Dominique Garmyn qui a accepté de co-diriger ma thèse. Merci à lui pour m'avoir apporté ses connaissances. Merci aussi pour ces longues, longues discussions.

Je tiens également à remercier les membres du jury : Loïc Bollache, Michel Gohar, Anne-Marie Pourcher et Romain Briandet d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de faire partie de mon jury de thèse. Merci également à Corinne Dorel-Flamant pour ses conseils lors des comités de suivi de thèse.

Et puis...je tiens à remercier toutes les personnes de mon équipe. Merci à Laurent pour ses chemises colorées qui ont contrées plus d'une fois, je suis sûre, la grisaille Dijonnaise, merci à Jean-Paul pour ses conseils sportifs et ses lapsus révélateurs, merci à Cécile pour ses anecdotes culturelles et ses tartes aux noix légendaires, merci à Elodie et Sébastien (dit *Bernadette*) pour leur bonne humeur et leur implication dans la vie du laboratoire. Merci à Gilles pour (évidemment) les dizaines de gâteaux qu'il a réussi à obtenir à la pause thé, pour ses choix musicaux formidables et pour tous ces instants sportifs que l'on a partagés...Quick, Mac Do, Domino's pizza ! Merci à Géraldine pour sa bonne humeur, sa culture musicale (sans toi nous n'aurions jamais réussi autant de quizz musical), son soutien et les précieuses pauses Snickers. Et un énorme merci à **Aude** pour...absolument tout : les discussions, les sourires, les rires, les conseils beauté et culinaire, les ragots, les voyages, les bières, et parfois même les larmes que l'on a partagés.

Merci à tous ceux qui m'ont accompagnée durant ce périple :

°Merci à David pour tous les bons moments passés au « Flannery's » et au « Bareuzai », ainsi que pour les kilomètres de course partagés avec moi.

°Merci à Aymé pour son génie des statistiques, son incroyable patience face à mes doutes et ses conseils si précieux. Merci pour son humour aussi saugrenu que le mien. Merci de m'avoir aidé à décimer des kilos de poissons (sushi king, planet sushi...nous voilà !). Et bien sur, un énorme merci pour son soutien.

°Merci à Chris d'avoir été aussi attentionné, d'être resté éveillé à mes côtés pendant les manip nocturnes et pour les nombreuses bières partagées,

°Merci à Chloé d'être aussi passionnée et déterminée ! Merci d'avoir partagé les pavés et merci pour l'initiation culinaire des « gâteaux-légumes »,
°Merci à Marie-Christine&Nadine pour leur complicité sans faille,
°Merci à Marie-Reine pour son génie des mots fléchés,
°Merci à Florentin pour avoir partagé l'apprentissage Qiime avec moi. Merci pour les grimpettes et sa bonne humeur *post-kir* !
°Merci à Fabien (et rosine), une telle connivence est belle à voir,
°Merci à Vincent... malgré ses choix footballistiques contestables,
°Merci à Jérémie pour les nombreuses soirées RockBand,
°Merci à Abdel pour ses attentions et son soutien footballistique,
°Merci à Marion pour sa maladresse légendaire,
°Merci à Nico pour m'avoir enseigné les techniques de self défense, malheureusement elles sont déjà loin et merci à Laure de les avoir testées avec moi,
°Merci à Farhan et Muhammad pour cette introduction à la culture Pakistanaise,
°Merci aux derniers venus : Kadiya, Veronika et Luiz, la relève est assurée.

Je n'oublie pas non plus les stagiaires qui ont ponctué ces années: Emilie, Elodie, Audrey et FX, une première vague chaleureuse et festive. Céline et Emeline, une seconde vague remplie de gentillesse et de chanson (un grand merci aussi pour les kilos de sols tamisés !). Je tiens aussi à remercier Yolaine. Quelle persévérance ! Et merci à Gaël...

Et puis également, un grand merci au *backstage* de l'INRA: Emilie Mugneret, Christine Devroe, Sylvie Belotti, Stéphanie Busset et Bernard Le Bihan, sans vous nous ne pourrions tout simplement pas travailler.

Résumé

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquiste responsable d'une infection d'origine alimentaire, la listériose. Ce pathogène a été isolé de divers environnements dont l'environnement tellurique. La présence de *L. monocytogenes* dans le sol pose des problèmes sanitaires du fait de son possible transfert vers les plantes cultivées, les animaux et productions animales et l'eau. Dans ce contexte, il est essentiel de déterminer les facteurs extrinsèque et intrinsèque qui impactent l'écologie de *L. monocytogenes* dans le sol.

Les études d'association génomique et les analyses transcriptomiques ont permis d'identifier qu'une part importante du génome de *L. monocytogenes* (7,3%) est dédiée à la régulation incluant 209 régulateurs transcriptionnels. Parmi eux, AgrA appartient à un système à deux composants du système de communication Agr. Nous avons étudié le rôle du régulateur transcriptionnel AgrA dans l'adaptation de *L. monocytogenes* au sol. La survie du mutant Δ agrA est significativement réduite dans les microcosmes de sol. De plus, une analyse transcriptomique a permis d'identifier que les taux de transcrits de 386 gènes et d'un large répertoire d'ARN non codant diffèrent significativement entre le mutant et la souche parentale. Les résultats suggèrent que la régulation de gènes et d'ARN non codant sous la dépendance d'AgrA pourrait être nécessaire pour l'adaptation optimale de *L. monocytogenes* au sol.

De plus, la co-inoculation de mutants au système Agr défectueux avec la souche parentale a montré que le mutant Δ agrA est moins compétitif, confirmant l'importance d'AgrA dans l'adaptation de *L. monocytogenes*. En revanche, au cours de co-cultures, la compétitivité du mutant Δ agrD est similaire à celle de la souche parentale, ce qui laisse présumer que le mutant Δ agrD tire avantage de la présence de la souche parentale.

L'un des facteurs extrinsèque essentiels susceptibles d'affecter la survie tellurique de *L. monocytogenes* est la composante biotique du sol. En effet, l'inactivation de la microflore du sol par ionisation lève l'inhibition de la croissance de *L. monocytogenes*. Au-delà de la seule abondance des communautés microbiennes, leur diversité influence le devenir des populations de *L. monocytogenes*. Par une approche de dilution jusqu'à extinction, nous avons démontré expérimentalement que l'érosion de la diversité microbienne se traduit par une meilleure survie de *L. monocytogenes* dans le sol. Nous avons démontré que les communautés microbiennes hautement diversifiées agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *L. monocytogenes* et que la composition phylogénétique de ces communautés doit être aussi considérée. Ces résultats suggèrent que l'érosion de la diversité pourrait accroître la circulation des microorganismes pathogènes dans l'environnement.

Mots-clefs : *Listeria monocytogenes*, adaptation, persistance, sol, régulation transcriptionnelle, communication, système Agr.

Abstract

Listeria monocytogenes is a ubiquitous bacterium responsible for listeriosis, a food-borne disease. This pathogen has been isolated from various environments of which the telluric environment. The presence of *L. monocytogenes* in soil can increase health hazards due to the risk of transfer to vegetables, animals and animal products and water. Considering the role of soil in the circulation of pathogens from farm environment to plant and animal products and eventually to foodstuff, it is critical to identify intrinsic and extrinsic factors that drive the fate of *L. monocytogenes* in soil.

Genome-wide and transcriptomic analyses found that an important part of the genome of *L. monocytogenes* (7.3%) is dedicated to regulation including 209 transcriptional regulators. Among these, AgrA is the response regulator of the two component system AgrC/AgrA which is part of the Agr communication system. We investigated the role of AgrA for *L. monocytogenes* adaptation to soil. A Δ agrA mutant displayed significantly reduced survival in soil microcosms. Additionally, microarray analyses identified 386 genes and a large repertoire of ncRNA as differentially transcribed between the mutant and the parental strain. The results presented here suggest that AgrA may be critical for the adaptation of *L. monocytogenes* by regulating an important network of genes and ncRNAs.

Moreover, co-inoculation of mutants of the Agr system with the parental strain showed that inactivation of the regulator AgrA resulted in a decrease of the fitness of the strain, confirming that AgrA is necessary for optimal *L. monocytogenes* adaptation. On the other hand, when co-cultured with the parental strain, the fitness of the Δ agrD mutant was not affected, indicating that the mutant Δ agrD took advantage of the parental strain.

Soil biology is a major extrinsic factor that conditions the fate of *L. monocytogenes* populations in soil. Inactivation of microbial communities lifted growth inhibition. Experimental erosion of soil microbial diversity showed that highly diverse soil microbial communities act as a biological barrier against *L. monocytogenes* invasion and that phylogenetic composition of the community also has to be considered. These results suggest that erosion of diversity may have damaging effects regarding circulation of pathogenic microorganisms in the environment.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, adaptation, persistence, soil, transcriptional regulation, communication, Agr system.

Table des matières

Introduction Générale	1
Chapitre 1. Introduction Bibliographique	5
<u>Listeria monocytogenes : Une bactérie pathogène ubiquiste</u>	<u>6</u>
1. Historique, taxonomie et caractéristiques de <i>L. monocytogenes</i>	6
1.1. Emergence d'un pathogène	6
1.2. Position taxonomique	6
1.3. Caractéristiques d'identification	7
1.4. Caractéristiques génomique	8
2. Niches écologiques de <i>L. monocytogenes</i>	10
2.1. Le sol	10
2.2. Les productions végétales	11
2.3. Les stations d'épuration et l'eau	12
2.4. Les animaux	13
2.5. Les industries agroalimentaires	14
2.6. Circulation de <i>L. monocytogenes</i>	14
2.6.1. Transfert de <i>L. monocytogenes</i> dans le sol	14
2.6.2. Transfert de <i>L. monocytogenes</i> vers les productions végétales	15
2.6.3. Transfert de <i>L. monocytogenes</i> aux animaux	15
2.6.4. Transfert de <i>L. monocytogenes</i> aux industries agroalimentaires	15
3. Listériose humaine	15
3.1. Mode de transmission	16
3.2. Symptomatologie	16
3.3. Processus infectieux	16
3.3.1. Internalisation, multiplication intracellulaire et dissémination de <i>L. monocytogenes</i>	17
3.3.2. Traversée de la barrière hémato-encéphalique	19
3.3.3. Traversée de la barrière foeto-placentaire	19
3.4. Épidémiologie	19
<u>Le sol : Un écosystème au centre de l'histoire naturelle de <i>L. monocytogenes</i></u>	<u>21</u>
1. Une matrice complexe	21
1.1. Texture du sol	21
1.2. Complexe argilo-humique	22
1.3. Solution et eau du sol	23

1.4. Echanges ioniques et capacité d'échange cationique	23
1.5. Atmosphère du sol	24
1.6. pH	24
2. Un réservoir d'organismes	24
2.1. Faune	24
2.2. Microorganismes	25
2.1.1 Une biomasse microbienne importante	25
2.1.2. Diversité et distribution des communautés microbiennes du sol	25
2.3. Virus	28
3. Ecologie de <i>L. monocytogenes</i> dans le sol	28
3.1. Paramètres abiotiques affectant la survie de <i>L. monocytogenes</i> dans le sol	29
3.2. Impact de la faune et de la microflore du sol sur la survie de <i>L. monocytogenes</i>	29
3.2.1. Relation de <i>L. monocytogenes</i> avec la faune du sol	30
3.2.2. Relation de <i>L. monocytogenes</i> avec la microflore du sol	31
<u>De la perception de l'environnement aux comportements coordonnés : Vers une approche sociomicrobiologique de l'écologie des bactéries</u>	32
1. Perception et intégration des signaux environnementaux : Le couplage de la régulation transcriptionnelle	32
1.1. Les acteurs de la régulation de l'initiation de la transcription	33
1.1.1. Facteurs sigma	33
1.1.2. Régulateurs transcriptionnels	34
1.1.3. Le cas particulier des systèmes à deux composants	35
1.2. La régulation de l'initiation de la transcription chez <i>L. monocytogenes</i>	36
1.2.1. Facteurs sigma chez <i>L. monocytogenes</i>	36
1.2.2. Régulateurs transcriptionnels chez <i>L. monocytogenes</i>	38
1.2.3. Les systèmes à deux composants chez <i>L. monocytogenes</i>	42
2. ARNs non codant, des acteurs de la régulation	44
2.1. Différents types d'ARN non codant	44
2.1.1. ARNs <i>cis</i> -régulateur : ribocommutateurs	44
2.1.2. ARNs antisens <i>cis</i> -régulateur	45
2.1.3. ARNs <i>trans</i> -régulateur	45
2.2. ARNs non codant et processus physiologiques chez <i>L. monocytogenes</i>	46
3. Réseau de régulation	48
4. Les systèmes de communication : Une innovation évolutive qui transforme notre vision du monde microbien	49

4.1. Les différents systèmes de communication cellulaire	49
4.1.1. Définition de la communication cellulaire	49
4.1.2. Systèmes basés sur la détection de peptides auto-inducteurs	50
4.1.3. Systèmes basés sur la détection d'acyl-homosérine lactones	52
4.1.4. Systèmes basés sur la détection d'auto-inducteurs 2	53
4.2. La communication cellulaire : Un concept à préciser	53
4.2.1. Perception de la densité de population : Quorum sensing	54
4.2.2. Des sondes pour la perception des conditions hydrodynamiques : Diffusion sensing	55
4.2.3. Une théorie rassemblant quorum sensing et diffusion sensing : Efficiency sensing	55
4.2.4. Comportements coopératif bactériens régulés par les systèmes de communication	56
4.2.5. Communication cellulaire, comportements sociaux et évolution	57
4.2.6. La communication cellulaire induit une hétérogénéité au sein des populations bactériennes	59
4.3. La communication cellulaire chez <i>L. monocytogenes</i>	61
4.3.1. Le système Agr	61
4.3.2. Rôle connu du système Agr	62
4.3.3. Hétérogénéité de l'expression du système Agr	64
4.4.4. Production d'AI-2 chez <i>L. monocytogenes</i> : Un système de détoxification	65
<u>Objectifs de la thèse</u>	66
Chapitre 2. La survie de <i>Listeria monocytogenes</i> dans le sol nécessite une régulation par AgrA.....	67
1. Avant-propos	68
2. Abstract	70
3. Introduction	70
4. Materials and methods	71
4.1. Bacterial strains and inoculum preparation	71
4.2. Soils characteristics and preparation of microcosms	72
4.3. Soil microcosm invasion assays	73
4.4. RNA extraction and cDNA synthesis	73
4.5. Whole-genome microarrays and data analysis	74
4.6. Quantitative PCR	74
4.7. Statistical analyses	75
5. Results	75

5.1. <i>L. monocytogenes</i> population dynamics are affected by the deletion of <i>agrA</i> in all biotic soil microcosms but not in sterilized soil microcosms	75
5.2. Transcriptome variations between the parental strain and the $\Delta agrA$ mutant are limited in sterilized soil environments	76
5.3. Presence of soil microbiota results in major differences between the parental strain and the $\Delta agrA$ mutant background	77
5.4. A repertoire of ncRNAs is differentially transcribed in the presence of soil microbiota	78
5.5. Real time PCR quantification of selected transcripts	78
6. Discussion	79
7. Bilan	82

Chapitre 3. L'activité du système Agr apporte un bénéfice aux populations de *Listeria monocytogenes* dans le sol..... 83

1. Avant-propos	84
2. Abstract	86
3. Introduction	86
4. Materials and methods	88
4.1. Bacterial strains and culture media	88
4.2. Soil samples and soil microcosms preparation	88
4.3. Soil microcosm inoculation with single strain and co-inoculation	89
4.4. Enumeration and determination of listerial populations dynamics	89
4.5. PCR amplification	89
4.6. Competitive index determination	90
4.7. Statistical analysis	90
5. Results and Discussion	90
5.1. Dynamics of listerial populations in soil microcosms	90
5.2. Comparison of the fitness of the mutants and parental strains in soil microcosms	91
6. Conclusion	94
7. Bilan	95

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol 96

1. Avant-propos	97
2. Article	98
3. Bilan	109

Discussion et Perspectives	110
Références Bibliographiques	123
Annexe	160
Revue : <i>Listeria monocytogenes</i> , a down-to-earth pathogen	161
Informations Supplémentaires	172
1. Informations supplémentaires du Chapitre 2	173
2. Informations supplémentaires du Chapitre 3	187
3. Informations supplémentaires du Chapitre 4	188

Liste des abréviations et des acronymes

σA/B/C/F/H/L	Sigma A/B/C/F/H/L
<i>A. castellanii</i>	<i>Acanthameba castellanii</i>
<i>A. lenticulata</i>	<i>Acanthameba lenticulata</i>
<i>A. polyphaga</i>	<i>Acanthameba polyphaga</i>
ABC (transporteur)	ATP binding cassette
ACE	abundance-based coverage estimator
Acyl-HSL	acyl-homosérine lactone
ADI	arginine deiminase
ADN	acide désoxyribonucléique
Agr	accessory gene regulator
AI-2	autoinducer-2
AIP	autoinducing peptide
ALOA	agar <i>Listeria</i> selon Ottaviani et Agosti
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	analysis of variance
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
ARNr	ARN ribosomique
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	brain heart infusion
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CAP	catabolite activator protein
CEC	capacité d'échange cationique
CMI	climate moisture index
CRP	cyclic AMP receptor protein
DBD	DNA binding domain
DPD	4,5-dihydroxyl-2,3-pentanedione
DS	diffusion sensing
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ECDPC	European center of disease prevention and control
EFSA	European food safety authority
ES	efficiency sensing
HGF	hepatocyte growth factor
HK	histidine kinase
Hpt	histidine phosphotransfer
InlA	internaline A
InlB	internaline B
InVS	institut national de veille sanitaire
<i>L. fleischmannii</i>	<i>Listeria fleischmannii</i>
<i>L. grayi</i>	<i>Listeria grayi</i>
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>L. ivanovii</i>	<i>Listeria ivanovii</i>

<i>L. marthii</i>	<i>Listeria marthii</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. rocourtiae</i>	<i>Listeria rocourtiae</i>
<i>L. seeligeri</i>	<i>Listeria seeligeri</i>
<i>L. weihonstephanensis</i>	<i>Listeria weihonstephanensis</i>
<i>L. welshimeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>
LI	lignée I
LII	lignée II
LIII	lignée III
LEB	<i>Listeria</i> enrichment broth
LIP1-1	<i>Listeria</i> pathogenicity island 1
LLO	listériolysine O
MID	multiplex identifier
ORF	open reading frame
OTU	operational taxonomical unit
<i>P. janthinellum</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>
<i>P. paxilii</i>	<i>Penicillium paxilii</i>
<i>P. sclerotiorum</i>	<i>Penicillium sclerotiorum</i>
<i>P. waksmanii</i>	<i>Penicillium waksmanii</i>
PALCAM	polymyxin-acriflavin-lithium-chloride-ceftazidime-aesculin-mannitol
Pc-PLC	phosphatidyl-choline phospholipase C
PCOa	principal coordinate analysis
Pi-PLC	phosphatidyl-inositol phospholipase C
PTS (système)	système de phosphotransférase dépendant du .phosphoenolpyruvate
PVPP	polyvinyl polypyrrolidone
Qiime	quantitative insights into microbial ecology
QS	quorum sensing
QSM (milieu)	quorum sensing medium
RBS	RNA binding site
RDP	ribosomal database project
RMQS	réseau de mesure de la qualité des sols
RR	régulateur de réponse
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAH	S-adénosyl homocystéine
SAM	S-adenosyl méthionine
SRH	S-ribosyl homocystéine
<i>T. pyriformis</i>	<i>tetrahymena pyriformis</i>
TSB	trypton soy broth
UniFrac	unique fraction of branches shared
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean
UTR	untranslated region
<i>V. fischeri</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>V. harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
VNC	viable non cultivable

Liste des tableaux

Chapitre 1. Introduction Bibliographique

Tableau 1. Occurrence de <i>L. monocytogenes</i> dans le sol	10
Tableau 2. Liste non exhaustive d'épidémie de Listériose liée à la consommation de denrées alimentaires contaminées	16
Tableau 3. Comparaison des taux d'incidence de diverses maladies d'origine alimentaire ainsi que de la fréquence d'hospitalisation et du taux de mortalité associés dans l'Union Européenne	20
Tableau 4. Indices couramment utilisés pour caractériser la diversité des communautés	26
Tableau 5. Dynamique des populations de <i>L. monocytogenes</i> après inoculation de microcosmes de sol	29
Tableau 6. Acteurs de la régulation de l'initiation de la transcription dont la fonction a été identifiée et décrite chez <i>L. monocytogenes</i>	36-37
Tableau 7. Quorum sensing, diffusion sensing et efficiency sensing	55

Chapitre 2. La survie de *Listeria monocytogenes* dans le sol nécessite une régulation par AgrA

Table 1. Characteristics of the soils used in this study: land-use, soil parameters and bacterial abundance	75
Table 2. Location, flanking genes and fold change of the ncRNA detected as differentially transcribed between the $\Delta agrA$ mutant and the parental strain under biotic conditions	79
Table 3. Comparison of the fold change ($\Delta agrA$ mutant versus parental strain) of selected genes in the microarray and qPCR analyses	80
Table S1. Target genes and specific primers designed for real time PCR confirmation of the results	173
Table S2. List of genes and ncRNAs differentially transcribed in the $\Delta agrA$ background in sterilized soil extract	174
Table S3. List of genes and ncRNAs differentially transcribed in the $\Delta agrA$ background in biotic soil extract	176
Table S4. List of genes and ncRNAs highly expressed (> 9 logarithm) with over 3 fold change in the $\Delta agrA$ mutant in biotic soil extract	184

Chapitre 3. L'activité du système Agr apporte un bénéfice aux populations de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Table 1. Competitive Indexes of co-cultured listerial strains over a 14-days period in sterilised soil microcosms.	92
Table 2. Competitive Indexes of co-cultured listerial strains over a 14-days period in biotic soil microcosms	92
Table S1. Sequences and genotypes targeted by the primers	187

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Table 1. Bacterial richness, diversity and evenness at a genetic distance of 5%	101
---	-----

Table 2. Phylogenetic communities composition of microcosms	103
Table 3. Relative abundance (%) of abundant genera (> 1% of total reads) detected as significantly different between microcosms	104
Table S1. Relative abundance of rare genera detected in the constructed microcosms	188

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction Bibliographique

Figure 1. Habitats et voies potentielles de transfert de <i>L. monocytogenes</i> dans l'environnement	14
Figure 2. Voies d'internalisation de <i>L. monocytogenes</i>	17
Figure 3. Cycle intracellulaire d'infection de <i>L. monocytogenes</i>	18
Figure 4. Représentation schématique des principaux gènes codant les protéines impliquées dans le cycle infectieux de <i>L. monocytogenes</i> chez l'Homme	19
Figure 5. Triangle des textures minérales et organiques	21
Figure 6. Schématisation du complexe argilo-humique	23
Figure 7. Comparaison de la richesse bactérienne du sol et de divers habitats	25
Figure 8. Distribution de la biomasse microbienne sur le territoire Français	25
Figure 9. Régulation du facteur Sigma F par les facteurs anti-Sigma SpoIIAB et anti-anti-Sigma SpoIIAA chez <i>B. subtilis</i>	33
Figure 10. Modes d'actions des régulateurs transcriptionnels activateurs et répresseurs	34
Figure 11. Système à deux composants	35
Figure 12. Régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle connues chez <i>L. monocytogenes</i>	39
Figure 13. Organisation et modalités de fonctionnement des ribocommutateurs	44
Figure 14. Différents type d'ARNs antisens <i>cis</i> -régulateur	45
Figure 15. Activation et répression de la traduction des ARNm par les ARNs <i>trans</i> -régulateur	45
Figure 16. Représentation schématique de la répression de l'expression de <i>coa</i> par appariement de RNAIII avec l'ARNm de <i>coa</i>	45
Figure 17. Représentation du système de communication Agr de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Figure 18. Représentation schématique de la circulation des acyl-HSLs chez <i>Vibrio fischeri</i>	51
Figure 19. Représentation schématique de la détection des acyl-HSLs par les systèmes à deux composants chez <i>Vibrio Harveyi</i>	52
Figure 20. Voie de synthèse des AI-2	53
Figure 21. Quorum sensing, diffusion sensing et efficiency sensing	54
Figure 22. Distribution spatiale et densité cellulaire	55
Figure 23. Hétérogénéité des populations de <i>Bacillus subtilis</i>	61
Figure 24. Représentation du système de communication Agr de <i>L. monocytogenes</i>	61
Figure 25. Alignement des séquences des propeptides AgrD de plusieurs espèces de <i>Listeria</i> et de <i>Staphylococcus</i>	62
Figure 26. Observation en microscopie confocale de l'hétérogénéité d'un biofilm formé par <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	64

Chapitre 2. La survie de *Listeria monocytogenes* dans le sol nécessite une régulation par AgrA

Figure 1. Principal components analysis (PCA) of soils	75
Figure 2. <i>L. monocytogenes</i> parental strain and $\Delta agrA$ mutant dynamics in sterilized and biotic soils	76
Figure 3. <i>L. monocytogenes</i> parental strain and $\Delta agrA$ mutant abundance after 14 days of incubation in biotic soil microcosms	77
Figure 4. Heat map of the set of genes with significant differences between the $\Delta agrA$ mutant and the parental strain under sterilized soil conditions	77
Figure 5. Heat map of the set of genes with significant differences between the $\Delta agrA$ mutant and the parental strain under biotic soil conditions	78
Figure 6. Functional categories identified as significant by gene ontology and percentage of genes from the set of genes with lower transcript levels in the $\Delta agrA$ mutant under biotic condition in comparison to the parental strain <i>L. monocytogenes</i> L9	78

Chapitre 3. L'activité du système Agr apporte un bénéfice aux populations de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Figure 1. Growth kinetics of <i>L. monocytogenes</i> parental strain and signal- and response-negative mutants in sterilized soil microcosms	90
Figure 2. <i>L. monocytogenes</i> parental strain and signal- and response-negative mutants survival in biotic soil microcosms	91
Figure 3. Dynamics of the parental strain, the response-negative mutant and the signal-negative mutant populations in sterilised soil microcosms. Single culture, co-culture with the parental strain, co-culture with the response-negative mutant, co-culture with the signal-negative mutant	91
Figure 4. Dynamics of the parental strain, the response-negative mutant and the signal-negative mutant populations in biotic soil microcosms. Single culture, co-culture with the parental strain, co-culture with the response-negative mutant, co-culture with the signal-negative mutant	92

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Figure 1. Bacterial communities implantation in γ -sterilized soils over a 32-days period	101
Figure 2. β -diversity analysis of the microcosms composition	101
Figure 3. Phylogenetic community composition of microcosms	102
Figure 4. Venn diagram representing shared and unique rare genera (< 1% of total reads) of microcosms	103
Figure 5. <i>L. monocytogenes</i> L9 survival over a 30-days period	104
Figure 6. Relative abundance of 16S and 18S rDNA gene copy number in the constructed microcosms	105
Figure 7. Jackknifed Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) cluster tree of the constructed microcosms	105

Introduction Générale

Listeria monocytogenes est l'agent responsable de la listériose, une infection sévère d'origine alimentaire qui touche essentiellement les personnes dont le système immunitaire est altéré. Ce pathogène est largement répandu dans l'environnement. Il a été isolé à partir des eaux (Bernagozzi *et al.*, 1994, Schaffter *et al.*, 2004, Lyautey *et al.*, 2007b), des effluents et des boues de stations d'épuration (Garrec *et al.*, 2003, Paillard *et al.*, 2005), de la végétation (Welshimer, 1968, Fenlon, 1985, Beuchat, 1996), des fermes agricoles (Nightingale *et al.*, 2004, Latorre *et al.*, 2009, Moshtaghi *et al.*, 2009), des fèces des animaux (Fenlon, 1985, Iida *et al.*, 1991, Ho *et al.*, 2007), des industries agroalimentaires (Goulet *et al.*, 1998, Holah *et al.*, 2004, Garrido *et al.*, 2009) ou bien encore à partir du sol (Welshimer & Donker-Voet, 1971, Dowe *et al.*, 1997, Locatelli *et al.*, 2013a).

La présence de *L. monocytogenes* dans l'environnement tellurique peut augmenter le risque de transfert vers les animaux, les produits animaux et les plantes en contact avec le sol et éventuellement vers les denrées alimentaires. Comprendre l'écologie et la circulation des bactéries pathogènes dans l'environnement est primordial pour contrôler de façon intégrée les risques sanitaires associés. Le sol est un écosystème complexe et hétérogène. Il est composé de matières minérales et organiques, d'un système hydrique, d'une atmosphère, d'un réseau de racines et d'un complexe biotique constitué de microorganismes, de virus et de faunes (micro, méso et macrofaune). Ces constituants, en constante interaction, influent sur la persistance de *L. monocytogenes* dans le sol. Les études menées sur la dynamique de populations de *L. monocytogenes* après inoculation de microcosmes de sol indiquent notamment que les paramètres physico-chimiques du sol ont un fort impact sur la survie de *L. monocytogenes* (Dowe *et al.*, 1997, Xiuping *et al.*, 2004, Moshtaghi *et al.*, 2009, McLaughlin *et al.*, 2011). De la même façon, la composante biotique du sol semble aussi avoir un impact la survie de *L. monocytogenes* (McLaughlin *et al.*, 2011, Locatelli *et al.*, 2013b) mais celui-ci n'est pas clairement défini.

La colonisation et/ou la persistance de *L. monocytogenes* dans cette niche écologique hétérogène nécessite l'intégration de signaux environnementaux et la régulation de l'expression de gènes cible. Les analyses transcriptomiques et les études pangénomiques réalisées ces dernières années ont permis de mettre en évidence qu'une part importante du génome de *L. monocytogenes* est dédiée à la régulation. Ceci inclut notamment 209 régulateurs transcriptionnels et 15 histidine kinases et 16 régulateurs de réponse constitutifs de système à deux composants (Glaser *et al.*, 2001). Les régulateurs transcriptionnels et les systèmes à deux composants de détection/régulation, décrits dans la littérature, sont connus

pour être impliqués dans le processus d'adaptation aux conditions environnementales (Skerker *et al.*, 2005, Mascher *et al.*, 2006). Parmi les systèmes à deux composants décrits chez *L. monocytogenes*, le système AgrC/AgrA fait partie intégrante du système de communication Agr. Ce système implique la synthèse de molécules signal, détectables par l'ensemble de la population, qui provoquent une régulation de l'expression des gènes, en fonction des fluctuations des conditions environnementales, afin d'adapter leur physiologie. Initialement décrit chez *Staphylococcus aureus*, le système de communication Agr est organisé en un opéron de 4 gènes, *agrBDCA*. Le gène *agrB* code une protéine membranaire permettant la maturation du propeptide AgrD en un peptide autoinducteur (AIP). La détection des AIP par l'histidine kinase AgrC induit une régulation transcriptionnelle par activation du régulateur AgrA. De nombreuses données concernant le rôle du système Agr sur la physiologie de *S. aureus* sont disponibles (Yarwood *et al.*, 2004, Novick & Geisinger, 2008, Queck *et al.*, 2008). A l'heure actuelle, le rôle du système de communication Agr dans l'adaptation de *L. monocytogenes* à son environnement est partiellement connu (Garmyn *et al.*, 2009). La littérature suggère que le système Agr de *L. monocytogenes* est impliqué dans l'adhésion aux surfaces abiotiques (Rieu *et al.*, 2007), dans les premières étapes de formation de biofilm (Rieu *et al.*, 2007, Riedel *et al.*, 2009) et lors de l'infection des hôtes (Autret *et al.*, 2003, Riedel *et al.*, 2009). Cependant, le rôle du système de communication dans l'adaptation des populations de *L. monocytogenes* dans l'environnement naturel et notamment dans l'environnement tellurique n'est pas décrit.

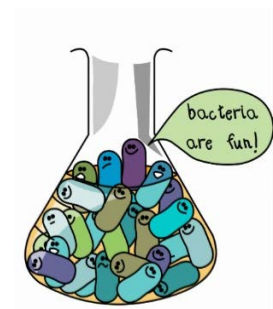
La communication cellulaire déclenche des comportements bactériens coordonnés qui peuvent être apparentés au comportement social de coopération qui semble apporter un avantage à la population bactérienne (Keller & Surette, 2006, Diggle *et al.*, 2007a). La mise en commun d'exoproduits favoriserait le développement de la population dans son ensemble. Ces exoproduits peuvent être détournés et utilisés par des individus de la population, appelés tricheurs qui, en retour, ne participent pas à leur production (Salunkhe *et al.*, 2005, Heurlier *et al.*, 2006, Sandoz *et al.*, 2007). A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée aux comportements sociaux ou à l'existence de tricheurs dans les populations de *L. monocytogenes*. Ainsi, des questions ouvertes persistent : « Le système de communication Agr est-il un trait social des communautés de *L. monocytogenes* ? », « Procure t-il un avantage aux bactéries qui l'exprime ? », « Peut-il être exploité ? ».

Dans ce contexte général, mes travaux de thèse visent à étudier la persistance de *L. monocytogenes* dans le sol et le rôle du système de communication Agr dans son

adaptation. Le premier chapitre de ce manuscrit est une synthèse des informations relatives à *L. monocytogenes*, son interaction avec le sol et les mécanismes dont dispose *L. monocytogenes* pour répondre aux conditions environnementales. Le deuxième chapitre rassemble les données d'une approche transcriptomique visant à étudier le rôle du régulateur AgrA et du système Agr dans l'adaptation de *L. monocytogenes* au sol. Le troisième chapitre vise à étudier l'impact de l'inactivation du système Agr sur la compétitivité de *L. monocytogenes* et apporte des éléments de réponse quant au rôle social du système Agr. Le quatrième chapitre s'intéresse à l'écologie de *L. monocytogenes* et plus particulièrement à l'effet barrière assuré par la diversité et de la composition des communautés microbiennes contre la persistance de *L. monocytogenes* dans le sol. Enfin, la discussion générale vise à faire la synthèse des différentes approches de façon à mieux caractériser l'écologie de cette bactérie pathogène dans le sol en relation avec les facteurs intrinsèques et extrinsèques qui conditionnent la dynamique des populations de *L. monocytogenes*.

Chapitre 1

Introduction Bibliographique



***Listeria monocytogenes* : Une bactérie pathogène ubiquiste**

1. Historique, taxonomie et identification

1.1. Emergence d'un pathogène

La description en 1926 par Murray *et al* d'un nouvel agent pathogène, dénommé *Bacterium monocytogenes*, suite à l'observation de plusieurs cas de mort soudaine de jeunes lapins de l'animalerie du département de pathologie de l'université de Cambridge, constitue la première description publiée de *L. monocytogenes*. En 1927, suite à des morts suspectes de gerbilles, Pirie *et al* isolent et décrivent également l'agent de la listériose. Du fait de son caractère pathogène et en l'honneur de Lord Lister, Pirie nomma ce nouvel agent infectieux *Listerella hepatolytica*. La similarité des deux découvertes obligea Murray et Pirie à renommer l'agent sous le nom de *Listerella monocytogenes*. Le nom *Listerella* étant déjà utilisé pour un champignon et un protozoaire, il fut rejeté en 1939 par la commission internationale du « Committee on Systematic Bacteriology ». Ce n'est qu'en 1940 que le nom définitif *Listeria monocytogenes* fut accordé et retenu par les « *Approved Lists of Bacterial Names* ».

1.2. Position taxonomique

Le genre *Listeria* appartient au groupe des bactéries présentant un pourcentage G+C inférieur à 50%. Dix espèces sont représentées dans le genre *Listeria* : *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* et *L. grayi* auxquelles s'ajoutent quatre espèces récemment identifiées : *L. marthii* (Graves *et al.*, 2010), *L. rocourtiae* (Leclercq *et al.*, 2010), *L. fleischmannii* (Bertsch *et al.*, 2013) et *L. weihenstephanensis* (Halter *et al.*, 2013). Dans le genre *Listeria*, *L. grayi* est l'espèce la plus éloignée phylogénétiquement (Collins *et al.*, 1991, Ryser & Marth, 1999a) et son appartenance au genre *Listeria* est remise en question sur la base de caractères génotypiques (G+C% plus élevé, faible homologie de l'ADN) et phénotypiques (légère variation de la structure antigénique). Parmi ces 10 espèces, deux sont pathogènes, *L. monocytogenes* pour l'Homme et les animaux et *L. ivanovii* principalement chez les animaux. Depuis son isolement, la systématique de *L. monocytogenes* a profondément évolué. Cette espèce bactérienne est à l'heure actuelle classée dans le phylum

des Firmicutes, classe des *Bacilli*, ordre des *Bacillales*, famille des *Listeriaceae* et dans le genre des *Listeria* (De Vos *et al.*, 2009).

1.3. Caractéristiques d'identification

L. monocytogenes se présente sous la forme de bacilles de 1 à 2 µm de longueur sur 0,5 µm de diamètre, aux extrémités arrondies, regroupés en palissades ou en courtes chainettes, motile à des températures avoisinant 20-25°C grâce à une ciliature péritriche mais immobiles ou faiblement motiles à 37°C. Dans une culture âgée, des filaments peuvent se former. La sporulation et la présence de capsule ne sont jamais observées. *L. monocytogenes* se cultive facilement sur gélose nutritive en 24h à 37°C et donne des colonies de 1 à 2 mm de diamètre, translucides, à bords réguliers.

L. monocytogenes est une bactérie Gram-positive possédant une catalase mais pas d'oxydase. Elle est aéro-anaérobie facultative. Son identification biochimique repose sur les caractères suivants : hydrolyse de l'esculine, présence d'une alpha-mannosidase, fermentation du D-arabitol, du L-rhamnose et du méthyl- alpha D- glucopyranoside, mais pas de fermentation du D-xylose, du D-ribose, du glucose-1-phosphate et du D-tagatose. De plus, *L. monocytogenes* ne produit pas d'indole, ni de sulfure d'hydrogène (H₂S) et ne possède pas de nitrate réductase, d'uréase ni de gélatinase. Son isolement peut se faire par l'intermédiaire de milieux sélectifs tels que les milieux Polymyxin-Acriflavin-Lithium-Chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol agar (PALCAM) et Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti (ALOA). Sur milieu PALCAM, l'hydrolyse de l'esculine par *Listeria* spp. se traduit par la formation d'un halo noir autour de colonies vert olive, ce qui permet de différencier *Listeria* spp de la majorité des autres microorganismes. Le milieu chromogénique ALOA permet d'identifier les bactéries du genre *Listeria* par la mise en évidence de l'activité bêta-glucosidase (colonies de couleur bleu-turquoise) et de différencier *L. monocytogenes* des autres espèces de *Listeria* spp. grâce à la formation d'un halo de précipitation des phospholipides clivés par une des phospholipases impliquées dans le processus infectieux.

Au sein de l'espèce *L. monocytogenes*, 12 antigènes somatiques (Ag O) et 4 antigènes flagellaires (Ag H) ont été identifiés, aboutissant à 13 sérotypes distincts. Quatre de ces sérotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c et 4b) sont responsables de 95% des cas de listériose humaine. Le sérotype d'une souche peut rapidement être établi par PCR multiplex (Doumith *et al.*, 2004a) par l'amplification simultanée de séquences spécifiques du génome (1/2a amplification de

lmo0737, 1/2c amplification de *lmo0737* et *lmo1118*, 1/2b amplification de ORF2819 et 4b amplification de ORF2819 et ORF2110).

D'un point de vue physiologique, *L. monocytogenes* est une bactérie psychrotolérante, capable de se développer à des températures avoisinant 4°C, et dont l'optimum de croissance est situé entre 30 et 37°C. *L. monocytogenes* peut croître en présence de 10% de NaCl. Son pH optimal de croissance est proche de la neutralité mais *L. monocytogenes* est capable de se développer à des pH compris entre 4,6 et 9 (De Vos et al., 2009).

1.4. Caractéristiques génomiques

La première séquence complète du génome de *L. monocytogenes*, publiée par un consortium européen en 2001 (Glaser *et al.*, 2001), a ouvert l'ère post génomique pour les chercheurs du domaine. Le génome de la souche séquencée (*L. monocytogenes* EGD-e) a une taille de 2 944 528 paires de bases et possède 2853 gènes codant des protéines d'au moins 50 résidus. L'analyse du génome révèle un répertoire étendu de gènes codant des protéines de surface, des protéines sécrétées, des transporteurs et des régulateurs transcriptionnels. Ces caractéristiques sont attendues pour des bactéries capables de coloniser des habitats très différents et d'y persister. Ainsi, 68 lipoprotéines putatives et 86 protéines sécrétées (5,4 % des gènes du génome de *L. monocytogenes* EGD-e) ont été identifiées *in silico*. Une partie d'entre elles assure des fonctions de dégradation comme les lipases ou chitinases, d'autres sont importantes pour la virulence de la souche. Trois cent trente et un gènes codant des protéines de transport sont présents dans le génome de *L. monocytogenes* EGD-e (11,6% des gènes du génome) dont 88 (26%) codent les éléments de systèmes de phosphotransférase dépendant du phosphoenolpyruvate (système PTS) pour le transport de glucides (Glaser *et al.*, 2001). Ce large ensemble de protéines intervenant dans le transport des glucides suggère que *L. monocytogenes* est capable d'utiliser des sources de carbone variées en fonction des ressources disponibles dans son environnement, notamment lors de son adaptation à l'environnement tellurique (Leisner *et al.*, 2008, Piveteau *et al.*, 2011) ou lors des étapes de la vie intracellulaire (Chico-Calero *et al.*, 2002). Un nombre important de gènes (209) soit 7,3% des gènes du génome de *L. monocytogenes* EGD-e, codent des régulateurs transcriptionnels (Glaser *et al.*, 2001). Cette proportion est la deuxième plus élevée parmi les génomes bactériens connus à ce jour. Quinze histidine kinases et 16 régulateurs transcriptionnels formant des systèmes à deux composants de détection/régulation ont également été identifiés.

En mars 2014, 61 génomes du genre *Listeria* sont disponibles (32 finis et 29 « draft ») (Markowitz *et al.*, 2012). Les analyses de génomique comparative ont permis de définir la taille du pan-, « core- » et « accessory » génome de *L. monocytogenes*. Le pangénome a été estimé à 4052 gènes (Deng *et al.*, 2010). 2330 à 2456 gènes font partie du « coregénome » soit environ 80% du génome de *L. monocytogenes* (Severino *et al.*, 2007, Deng *et al.*, 2010, Den Bakker *et al.*, 2013). Cette répartition majoritaire des gènes dans le « coregénome » est révélatrice d'un degré de conservation important du génome dans l'espèce *L. monocytogenes* (Den Bakker *et al.*, 2013). Selon les souches, l'« accessory » génome représente 12 à 23% du génome (Deng *et al.*, 2010). Les gènes codant des systèmes PTS, des composants de la paroi cellulaire, des régulateurs transcriptionnels et des éléments impliqués dans la mobilité sont présents à la fois dans le « core- » et l'« accessory » génome (Den Bakker *et al.*, 2013, Vivant *et al.*, 2013a) (Annexe). La répartition de ces gènes conforte leur importance dans l'adaptation de *L. monocytogenes* ainsi que le caractère ubiquitaire de la bactérie.

De plus, la comparaison du génome d'un représentant de l'espèce « pathogène » *L. monocytogenes* et de l'espèce « non pathogène » *L. innocua* a mis en évidence 270 gènes spécifiques à l'espèce pathogène. Parmi ces gènes se retrouvent des protéines sécrétées, des perméases spécifiques aux β -glucosides, des régulateurs transcriptionnels (dont le régulateur transcriptionnel PrfA) et des enzymes impliquées dans la dégradation d'acides et de sels biliaires (Glaser *et al.*, 2001). De plus, la vie intracellulaire de *L. monocytogenes* nécessite l'action d'une batterie de protéines. Les gènes codant ces protéines sont regroupés dans un îlot de pathogénécité, appelé LIPI-1, qui est absent chez *L. innocua* (Chakraborty *et al.*, 2000). Ces gènes, uniques à *L. monocytogenes*, expliquent la capacité d'invasion et le caractère pathogène de *L. monocytogenes*.

Environ 30% des isolats de *L. monocytogenes* contiennent de l'ADN extrachromosomique (Lebrun *et al.*, 1992, Kuenne *et al.*, 2010). Parmi celles-ci, les souches isolées des environnements agroalimentaires ou de produits alimentaires sont majoritaires (Harvey & Gilmour, 2001). Ces plasmides confèrent une résistance à des métaux lourds (cadmium, cuivre, arsenic), à des antibiotiques (ampicilline, gentamicine, chloramphénicol, rifampicine...) et au stress oxydatif grâce à l'expression de pompes à efflux (Lebrun *et al.*, 1992, Kuenne *et al.*, 2010). De façon intéressante, un plasmide porteur de gènes appartenant à la famille des internalines, protéines associées à la virulence de la bactérie, a récemment été découvert chez des souches de *L. monocytogenes* isolées d'animaux atteints de listériose (Den

Tableau 1. Occurrence de *L. monocytogenes* dans le sol (Vivant *et al.*, 2013) (Annexe).

Références	Nombre d'enrichissement	Milieu d'enrichissement	Condition d'incubation	Pourcentage de sol détecté comme positif
(Welshimer & Donker-Voet, 1971)	2	BHI*	4°C, 3 mois et demi à 5 mois 37°C, 24h	92% des échantillons agricoles 86 % des échantillons non agricoles
(Weis & Seeliger, 1975)	1	Lehnert + acriflavine (10µg/ml)	22°C, 7 jours	20% des sols et plantes prélevés
(Macgowan <i>et al.</i> , 1994)	2	LEB** LEB	30°C, 48h 30°C, 7 jours	0,7%
(Garcia <i>et al.</i> , 1996)	1	NC	NC	8,3%
(Dowe <i>et al.</i> , 1997)	2	LEB Frazer broth	30°C, 48h 35°C, 24 à 48h	27%
(Nightingale <i>et al.</i> , 2004)	1	LEB	30°C	24%
(Fox <i>et al.</i> , 2009)	1	LEB	48h	19%
(Sauders <i>et al.</i> , 2012)	1	LEB	30°C, 24 à 48h	4,4% des sols, plantes et eaux prélevés
(Locatelli <i>et al.</i> , 2013a)	2	LEB LEB modifié	37°C, 48h 37°C, 24h	17% sont positifs dans au moins 1 des 3 procédures
	2	Frazer broth Frazer broth	37°C, 48h 37°C, 48h	
	1	Frazer broth	4°C, 2 mois	
(Strawn <i>et al.</i> , 2013)	1	LEB + supplément d'enrichissement pour <i>Listeria</i>	30°C, 24 à 48h	15% des sols, eaux et fèces prélevés

* Brain heart infusion, ** *Listeria* enrichment broth, NC: non communiqué

Bakker *et al.*, 2012). Ceci suggère que la présence de ce plasmide pourrait augmenter la virulence de la souche.

Les analyses de génomique comparative ont également été utilisées pour étudier la diversité génomique au sein de *L. monocytogenes* (Doumith *et al.*, 2004b, Deng *et al.*, 2010, Den Bakker *et al.*, 2013). *L. monocytogenes* comprend au moins trois lignées génétiques distinctes: la lignée I (LI) est principalement identifiée dans les cas épidémiques de listériose humaine, les représentants de la lignée II (LII), fréquemment isolées des denrées alimentaires, de l'environnement agricole, de la nature sont aussi liés aux cas sporadiques de listériose humaine ; la lignée III (LIII) est marginalement associée à des listérioses animales (Orsi *et al.*, 2011). Les LI et LII partagent 86 gènes absents ou hautement divergents de la LIII. Les fonctions putatives des protéines codées par ces gènes pourraient en partie expliquer la distribution des lignées. En effet, les protéines codées par les gènes spécifiques aux LI et LII sont principalement liées au métabolisme et au transport des carbohydrates, à la régulation, à l'adaptation dans le tractus gastro-intestinal (Deng *et al.*, 2010) et aux protéines de surface (Hain *et al.*, 2012). En revanche, chaque lignée est caractérisée par un « set » spécifique de protéines (Doumith *et al.*, 2004b). Par exemple, la listériolysine S est une hémolysine uniquement retrouvée dans une partie de la LI ou encore, des souches de la LII portent des plasmides qui leur confèrent une résistance aux métaux lourds, aux bactériocines et autres composés retrouvés dans l'environnement (Orsi *et al.*, 2011). Les variations génotypiques des lignées pourraient s'expliquer par la variété des niches écologiques de *L.monocytogenes*.

2. Niches écologiques de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes est une espèce bactérienne ubiquiste présente dans de nombreux habitats. Outre la grande diversité d'habitats que *L. monocytogenes* peut coloniser, cette bactérie a la faculté d'y persister pendant de longues périodes.

2.1. Le sol

Le sol est un habitat de *L. monocytogenes* (Tableau 1). Les premiers travaux démontrant la présence de *L. monocytogenes* dans les sols remontent aux années 1960 et 1970 (Welshimer, 1960, Welshimer & Donker-Voet, 1971). En 1975, une étude réalisée dans le sud de l'Allemagne a montré la présence de *L. monocytogenes* dans 13% à 18,7% des sols cultivés, 51,4% des sols non cultivés, 8,7% des sols de prairie et 15,2% des sols de forêt (Weis & Seeliger, 1975). Plusieurs publications plus récentes ont confirmé que le sol est une

niche pour *L. monocytogenes*. La forte occurrence de *L. monocytogenes* dans les sols non cultivés a également été mise en évidence au Canada (Dowe *et al.*, 1997). Cette étude montre que 46,2% des sols non cultivés sont positifs à *L. monocytogenes* contre 7,7% des sols cultivés. La présence de *L. monocytogenes* a également été mise en évidence dans les sols de fermes de bovins, ovins et caprins (Nightingale *et al.*, 2004), d'exploitations laitières (Fox *et al.*, 2009) et maraîchères (Strawn *et al.*, 2013). De même, aux Etats-Unis, *L. monocytogenes* a été détectée dans 1,6% des sols prélevés. Cette prévalence est nettement supérieure dans l'habitat urbain où 11,6% des sols étaient positifs à *L. monocytogenes* (Sauders *et al.*, 2012). En France, la présence de *L. monocytogenes* a également été mise en évidence dans des sols de prairie avec une incidence de 17% (Locatelli *et al.*, 2013a).

Toutes ces études sont basées sur des approches culturales qui intègrent une ou plusieurs étapes d'enrichissement sélectif ce qui laisse présumer que les populations de *L. monocytogenes* sont en général faibles. Les résultats d'une approche moléculaire basée sur la détection d'un fragment d'un gène spécifique par PCR Taqman développée pour étudier la prévalence de *L. monocytogenes* sur la totalité du territoire français a confirmé que les populations sont inférieures à 10^4 par gramme de sol sec (Locatelli *et al.*, 2013a).

2.2. Les productions végétales

L. monocytogenes a été détectée dans l'environnement agricole au niveau des ensilages. Suivant le conditionnement de l'ensilage, 2,5% à 22,2% des ensilages prélevés dans l'environnement agricole contenaient *L. monocytogenes* (Fenlon, 1985). De la même façon, 38% des échantillons d'ensilage prélevés quotidiennement dans une ferme laitière étaient positifs pour la recherche de *L. monocytogenes* (Ho *et al.*, 2007). Dans une moindre mesure, *L. monocytogenes* a également été détectée dans 2,3% et 2,6% des ensilages réalisés respectivement à partir de maïs et de foin (Pauly & Tham, 2003). *L. monocytogenes* peut y survivre plusieurs mois, lorsque les conditions d'anaérobies ne sont pas respectées et/ou que le pH de l'ensilage n'est pas suffisamment bas (>4).

Le comportement de *L. monocytogenes* sur des graines de carotte, cresson, laitue, radis, épinard et tomate a été décrit (Jablasone *et al.*, 2005). Les graines étaient rapidement colonisées et la population du pathogène se maintenait entre 10^5 et 10^6 UFC/g pendant 9 jours après germination. Lors de cette étude, *L. monocytogenes* a également été détectée sur les feuilles des jeunes plants mais aucune internalisation de la bactérie n'a été observée. Les légumes, tels que les carottes et les radis, maintenus en contact direct avec le sol tout le long

de leur développement, sont donc une catégorie de produits potentiellement exposés à *L. monocytogenes*. Après 3 mois de développement dans du sol artificiellement contaminé par *L. monocytogenes*, 50% des radis étaient contaminés (van Renterghem *et al.*, 1991). La contamination n'est cependant pas systématique puisque *L. monocytogenes* n'était pas détectée sur des carottes cultivées dans des conditions similaires. Après inoculation de pousses d'orge, les racines et les plants étaient colonisés par *L. monocytogenes* mais, à nouveau, aucune internalisation n'a été notée (Kutter *et al.*, 2006).

La présence de *L. monocytogenes* dans les productions végétales a souvent été mise en évidence suite à des cas décrits de listériose (Brandl, 2006). Les choux et salades (Jamali *et al.*, 2013, Uzeh & Adepoju, 2013), les melons (Laksanalamai *et al.*, 2012) et le maïs (Valk *et al.*, 2005) ont par exemple déjà été identifiés comme porteurs de *L. monocytogenes*. De plus, une revue bibliographique détaillant l'incidence de *L. monocytogenes* dans les légumes montre que les pousses de soja, les choux, les concombres, les pommes de terre, les radis et les tomates peuvent être de possible vecteur de *L. monocytogenes* (Beuchat, 1996).

2.3. Les stations d'épuration et l'eau

L. monocytogenes est souvent détectées dans les eaux usées et les effluents. Une forte incidence de *L. monocytogenes* a pu aussi être détectée dans les échantillons prélevés au point de sortie des effluents de stations d'épuration municipales et d'une industrie agroalimentaire (Czeszejko *et al.*, 2003). Egalement, parmi les 29 souches de *Listeria* isolées d'échantillons provenant de stations d'épuration, 21 ont été associées à l'espèce *L. monocytogenes* (Bernagozzi *et al.*, 1994). En France, pour évaluer la prévalence moyenne de *L. monocytogenes* dans les stations d'épuration, une étude a été menée sur une période d'un an sur les eaux usées traitées dans 6 stations d'épuration. Cette étude montre une prévalence moyenne de *L. monocytogenes* de 84% (Paillard *et al.*, 2005). Au cours du processus d'assainissement des eaux usées en station d'épuration, des boues sont produites. Cinquante à 60% de ces boues, une fois stabilisées, séchées ou « hygiénisées », servent en agriculture pour fertiliser les sols. La qualité des boues des stations d'épuration servant à l'épandage est donc un point critique pour la qualité sanitaire des sols. De plus, la présence du pathogène dans les eaux usées traitées soulève un éventuel problème sanitaire du fait de leur rejet dans l'environnement et leur utilisation pour l'irrigation des cultures. Des études réalisées en France, concernant des stations d'épuration utilisant différents types de traitements, montrent que les boues et les effluents traités sont fréquemment porteurs de *L. monocytogenes*. Ainsi

55% à 80% des boues seraient contaminées par la bactérie (Garrec *et al.*, 2003, Paillard *et al.*, 2005).

Les eaux de rivière, de lac (Bernagozzi *et al.*, 1994, Lyautey *et al.*, 2007b), les eaux de surface de montagne et les eaux souterraines (Schaffter & Parriaux, 2002, Schaffter *et al.*, 2004), peuvent également véhiculer *L. monocytogenes*. Ces eaux servent de réservoir d'eau potable pour les Hommes et les animaux.

2.4. Les animaux

Les animaux de rente (bovins porcins, ovins, caprins et équins) sont porteurs de *L. monocytogenes* (Nightingale *et al.*, 2004, Nightingale *et al.*, 2005). L'incidence de *L. monocytogenes* est supérieure dans les fermes de bovins que dans les fermes de petits ruminants (ovins et caprins), respectivement 33% et 8% (Ryser & Marth, 1999b), et 24% et 6% (Nightingale *et al.*, 2004). De plus, la prévalence du pathogène varie suivant les saisons. Elle est plus élevée durant la période hivernale. Ce phénomène peut être expliqué par l'accroissement des risques de contamination pendant la stabulation des animaux (Nightingale *et al.*, 2005). L'utilisation des ensilages durant l'hiver pourrait également expliquer l'augmentation des cas de contamination sur cette période. Dans une autre étude, 57 de 298 échantillons (fèces de bovins, lait, ensilage, sol et eau) prélevés dans 16 fermes étaient positifs à *L. monocytogenes*, soit une prévalence de 19% (Fox *et al.*, 2009). Le suivi de l'excrétion de *L. monocytogenes* dans une exploitation laitière a en effet montré que jusqu'à 94% des vaches avaient excrété au moins une fois *L. monocytogenes* durant la période d'étude (Ho *et al.*, 2007). De plus, le portage intestinal de *L. monocytogenes* et sa présence dans les fèces ont été démontrés pour de nombreuses espèces animales (Wesley, 1999). Les animaux sauvages (Gray & Killinger, 1966, Kalorey *et al.*, 2006, Lyautey *et al.*, 2007a), les volailles et les oiseaux sauvages (Weis & Seeliger, 1975, Fenlon, 1985, Iida *et al.*, 1991, Weber *et al.*, 1995a, Bouttefroy *et al.*, 1997, Kalorey *et al.*, 2006), les chiens et les chats (Iida *et al.*, 1991, Weber *et al.*, 1995b) et les rats (Iida *et al.*, 1991) peuvent aussi être porteurs de *L. monocytogenes*.

Ce portage animal de *L. monocytogenes* dans l'environnement agricole peut conduire à la contamination des productions animales comme le lait cru (Fenlon *et al.*, 1995, Yoshida *et al.*, 1998, Hunt *et al.*, 2012) ou la viande (Mohammed *et al.*, 2010, Morild *et al.*, 2011, Dmowska *et al.*, 2013). La contamination des matières premières agricoles est une voie d'entrée du pathogène vers le secteur agroalimentaire.

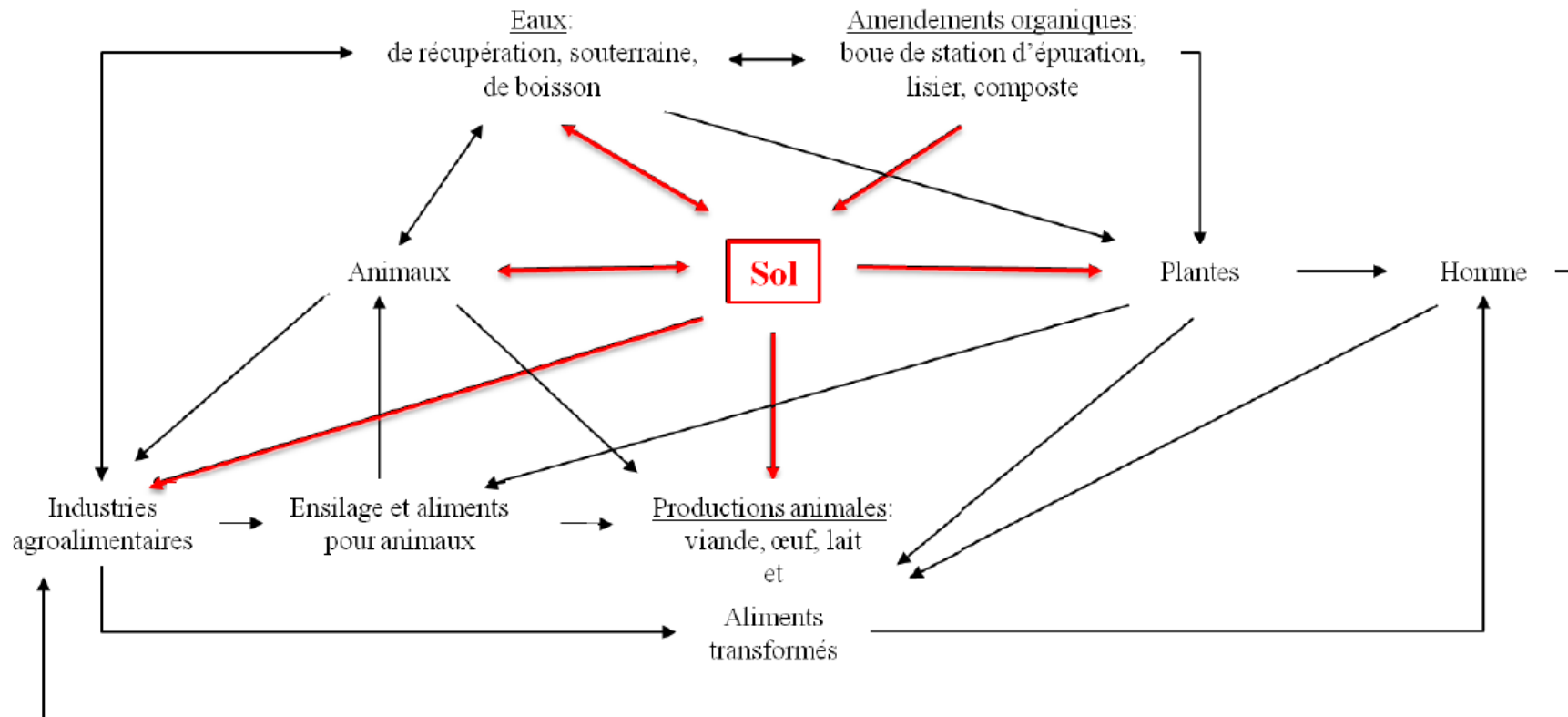


Figure 1. Habitats et voies potentielles de transfert de *L. monocytogenes* dans l'environnement.

2.5. Les industries agroalimentaires

Tous les secteurs agroalimentaires, qu'il s'agisse de l'industrie laitière, de transformation de la viande, maraîchère ou aquacole peuvent être contaminés par cette bactérie. La contamination peut aussi bien survenir au niveau des matières premières que lors de la transformation et la distribution des produits finis. Les capacités de *L. monocytogenes* à coloniser les surfaces des ateliers alimentaires (sol, mur, canalisation, équipement) et à s'y développer sous forme de biofilms jouent un rôle dans la persistance du pathogène dans les industries (Beresford *et al.*, 2001, Tresse *et al.*, 2007, van Houdt & Michiels, 2010, Renier *et al.*, 2011). Sous cette forme, *L. monocytogenes* est capable de persister dans l'environnement industriel plusieurs mois voire plusieurs années (Orgaz *et al.*, 2013).

Ainsi, la présence du pathogène a été observée dans les réservoirs de stockage du lait et dans les équipements de production (Latorre *et al.*, 2010), dans les entreprises de fumaison du saumon (Serio *et al.*, 2011) ou bien encore dans les ateliers de transformation de la viande (Gamboa-Marin *et al.*, 2012). Les contaminations résultant de la présence de *L. monocytogenes* ont un impact socio-économique pour les industries du fait des maladies qui en résultent parfois chez le consommateur.

2.6. Circulation de *L. monocytogenes*

L'écologie de *L. monocytogenes* est complexe. Les voies de transfert d'un habitat à l'autre sont multiples (Figure 1).

2.6.1. Transfert de *L. monocytogenes* dans le sol

Comme indiqué précédemment, le sol est un réservoir de *L. monocytogenes*. Le sol joue un rôle central dans le transfert du pathogène. Certaines pratiques telles que le recyclage agricole des produits résiduels organiques (boues de station d'épuration, lisiers et composts) ou encore l'irrigation avec des eaux de mauvaise qualité microbiologique pourraient être des voies d'entrée des pathogènes dans le sol (Garrec *et al.*, 2003, Paillard *et al.*, 2005). L'épandage de boues de station d'épuration sur les terres agricoles résulterait en l'apport de 10^6 à 10^8 *L. monocytogenes* par hectare et par an (Garrec *et al.*, 2003, Paillard *et al.*, 2005). Les animaux pourraient également constituer une voie d'entrée du pathogène dans le sol du fait de la quantité importante de portage asymptomatique de *L. monocytogenes* par le bétail (Wesley, 1999).

2.6.2. Transfert de *L. monocytogenes* vers les productions végétales

La dissémination de *L. monocytogenes* à partir du sol pourrait être une étape clef du cycle de propagation de la bactérie. La présence de *L. monocytogenes* dans le sol implique un risque de transfert de la bactérie à la végétation et aux productions agricoles végétales. Divers modes de transfert ont été proposés pour expliquer le passage de *L. monocytogenes* du sol aux végétaux. La contamination des productions végétales (plantes potagères et aromatiques) peut avoir lieu lors de la germination des graines dans le sol (Jablasone *et al.*, 2005). Un autre mode de transmission aux productions végétales est par contact direct des légumes lors de leur développement dans le sol (van Renterghem *et al.*, 1991). Les parties aériennes des légumes sont aussi sujettes aux contaminations par contact direct avec le sol (Jablasone *et al.*, 2005). Les éclaboussures apportées par la pluie ou l'arrosage constituent une possibilité de transfert du sol aux productions végétales. Dans la littérature, un tel transfert a par exemple été montré pour une souche de *L. innocua* vers les parties aériennes du persil (Girardin *et al.*, 2005) et vers les feuilles de salade (Oliveira *et al.*, 2011).

2.6.3. Transfert de *L. monocytogenes* aux animaux

Les principales voies de contamination des animaux (en particulier les animaux de rente) sont l'ensilage (Vazquez-Boland *et al.*, 1992, Welchman *et al.*, 1997) et les animaux eux-mêmes. Les animaux porteurs excréant *L. monocytogenes* contribuent à la dispersion du pathogène dans le sol et la nourriture du bétail, créant ainsi un cycle continu fécal-oral (Nightingale *et al.*, 2004, Ho *et al.*, 2007).

2.6.4. Transfert de *L. monocytogenes* aux industries agroalimentaires

La contamination des matières premières végétales et animales est une voie importante d'entrée de *L. monocytogenes* dans les entreprises agroalimentaires (Fox *et al.*, 2011, Gelbicova & Karpiskova, 2012). Ceci pose des problèmes sanitaires puisque la présence de *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires entraîne la contamination d'une part non négligeable des denrées alimentaires (Cox *et al.*, 1997). L'aliment est le principal vecteur de la maladie listériose.

3. Listériose humaine

La capacité de *L. monocytogenes* à causer une infection chez l'Homme tient au fait qu'elle peut pénétrer les cellules non phagocytaires, traverser la barrière intestinale, survivre dans les macrophages et traverser les barrières hémato-encéphalique et faeto-placentaire.

Tableau 2. Liste non exhaustive d'épidémies de Listériose liées à la consommation de denrées alimentaires contaminées.

Foyer de l'épidémie	Année	Aliment contaminé	Nombre de patients contaminés	Taux de mortalité (%)	Référence
Canada	1981	Salade de choux	41	34	(Schlech <i>et al.</i> , 1983)
France	1992	Langue de porc en gelée	279	23	(Rocourt <i>et al.</i> , 1993, Goulet, 1995, Jacquet <i>et al.</i> , 1995)
France	1993	Rillettes	38	ND*	(Goulet, 1995, Goulet <i>et al.</i> , 1998)
Suisse	1994	Fromage	57	32	(Büla <i>et al.</i> , 1995)
France	1995	Brie	36	20	(Valk <i>et al.</i> , 2005)
France	1997	Fromage	14	13	(Valk <i>et al.</i> , 2005)
Italie	1997	Salade de maïs	1566	ND	(Valk <i>et al.</i> , 2005)
Etats-Unis	1998	Hot-dog	108	17	(Graves <i>et al.</i> , 2005)
Finlande	1999	Beurre	18	22	(Autio <i>et al.</i> , 1999, Valk <i>et al.</i> , 2005)
France	2000	Langue de porc en gelée	32	ND	(Valk <i>et al.</i> , 2005)
Suisse	2005	Fromage	12	42	(Bille <i>et al.</i> , 2006)
Allemagne	2006	Fromage	189		(Koch <i>et al.</i> , 2010)
Norvège	2007	Camembert	17	18	(Johnsen <i>et al.</i> , 2010)
Canada	2008	Charcuterie	57	39	(Taillefer <i>et al.</i> , 2009)
Danemark	2009	Plat préparé	14	14	(Smith <i>et al.</i> , 2011)
Autriche-Allemagne	2010	Fromage	14	29	(Fretz <i>et al.</i> , 2010)
Etats-Unis	2011	Pastèque	147	22	(Shaun <i>et al.</i> , 2011)

* ND non déterminé

3.1. Mode de transmission

Le mode de transmission le plus classique de la listériose chez l'Homme est l'ingestion de denrées alimentaires contaminées (Tableau 2). La capacité de *L. monocytogenes* à survivre dans des conditions de stress osmotique, salin et acide, et son aptitude à se multiplier à des températures basses lui permettent de survivre dans une large gamme d'aliments (Boerlin *et al.*, 1997, Goulet *et al.*, 1998, Miettinen *et al.*, 1999, Rocourt *et al.*, 2003, Koch *et al.*, 2010, Jamali *et al.*, 2013). Les aliments les plus à risque pour la transmission de la listériose sont les aliments dont la durée de conservation est longue et dont la consommation peut se faire en l'état (pas de cuisson nécessaire) (Porto-Fett *et al.*, 2013). Se retrouvent notamment dans cette catégorie les fromages fabriqués à partir de lait cru, les produits de charcuterie, les légumes crus, les produits de la mer et les plats préparés.

Un autre mode de transmission beaucoup plus rare est le contact direct avec un animal contaminé (Cain & McCann, 1986, McLauchlin & Low, 1994). Enfin la transmission peut également se faire de la mère au fœtus ou au nouveau-né par passage de la bactérie du sang de la mère au placenta ou lors de l'accouchement (Smith *et al.*, 2009, Tahery *et al.*, 2009, Mokta *et al.*, 2010).

3.2. Symptomatologie

Les manifestations cliniques dues à l'infection par *L. monocytogenes* dépendent du statut immunitaire des patients. Pour sa forme bénigne, les symptômes caractéristiques sont définis comme un état pseudo-grippal, courbatures, maux de tête, crampes et fièvres accompagné de diarrhées. Cette forme bénigne touche les personnes en bonne santé ayant consommé un aliment fortement contaminé. Lorsque le sujet présente un système immunitaire altéré (sujets atteints de cancer, du SIDA, de maladies hépatiques et ayant bénéficié de transplantations d'organes) la maladie peut se traduire par une septicémie ou par l'infection du système nerveux central provoquant ainsi méningite ou méningo-encéphalite. Pour le cas particulier des femmes enceintes, la maladie est extrêmement dangereuse pour le fœtus puisque l'infection peut aboutir à la mort *intra utero*, à un accouchement prématuré ou à une infection néonatale (détrences respiratoires et neurologiques).

3.3. Processus infectieux

Le tractus digestif représente un environnement hostile dans lequel *L. monocytogenes* est confrontée à divers stress. Plusieurs mécanismes de réponse au stress qui participent à la survie au cours de la digestion ont été décrits (Sleator *et al.*, 2009). Ainsi, en réponse à

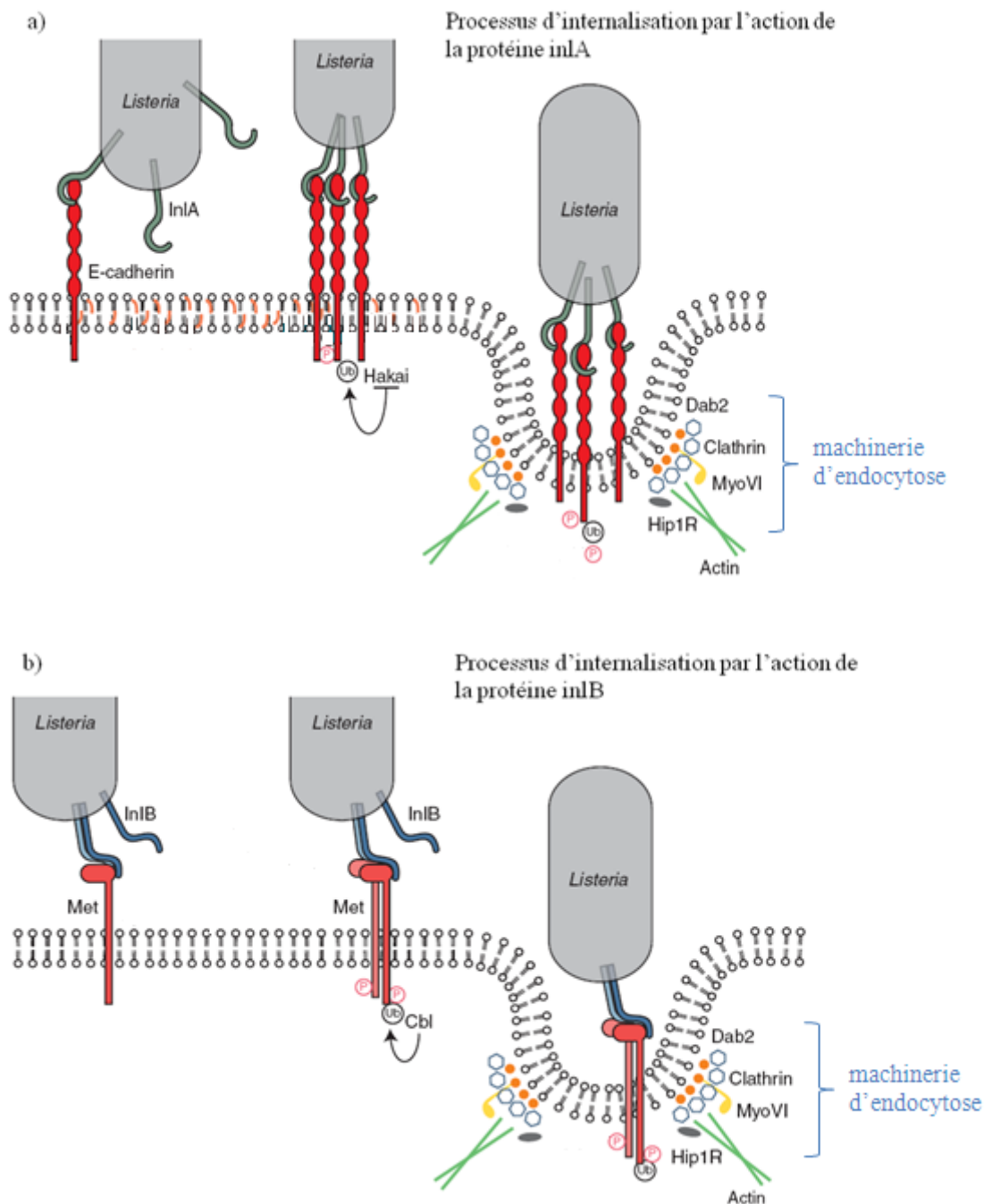


Figure 2. Voies d'internalisation de *L. monocytogenes*. L'interaction de InlA et/ou InlB avec leur récepteur spécifique (respectivement E-cadherine et Met) induit l'ubiquitination des récepteurs par les ligases ubiquitines Hakai pour le récepteur E-cadherine et Cbl pour le récepteur Met ; et le recrutement de la machinerie d'endocytose par vésicules de clathrines (Dab2, clathrine, Hip1R, MyoVI) qui permet la polymérisation du cytosquelette d'actines. D'après : (Pizarro-Cerda *et al.*, 2012).

l'acidité du suc gastrique (HCl) dont le pH est voisin de 2, l'activité glutamate décarboxylase permet d'élever le pH intracellulaire grâce à la conversion du glutamate extracellulaire en gamma-aminobutyrate, réaction qui consomme un proton intracellulaire (Cotter *et al.*, 2001). De plus, l'activité arginine deiminase, fonctionnelle chez *L. monocytogenes*, semble être impliquée dans la résistance à l'acidité (Ryan *et al.*, 2008). Le suc pancréatique et la bile, à l'inverse du suc gastrique, possèdent un pH élevé. Les sels biliaires provoquent la lyse des cellules par dissolution des phospholipides, du cholestérol et des protéines de la membrane cellulaire des micro-organismes. *L. monocytogenes* exprime une hydrolase des sels biliaires codée par le gène *bsh* et un système d'exclusion de la bile codé par le gène *bilE* qui lui confère une résistance aux sels biliaires (Begley *et al.*, 2005, Sleator *et al.*, 2005). Par ailleurs, le remaniement de l'architecture et de la composition de la membrane cellulaire participe également à cette résistance (Begley *et al.*, 2002). *L. monocytogenes* doit également faire face à un stress osmotique lors de son entrée dans l'intestin grêle (jusqu'à 0,3 M de NaCl) (Chowdhury *et al.*, 1996). Ce stress induit l'expression des gènes *opuC*, *belT* et *gbu* (Cetin *et al.*, 2004, Kazmierczak *et al.*, 2006) qui codent des transporteurs d'osmolytes permettant la régulation de la distribution de solutés compatibles à travers la membrane cytoplasmique (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002). La mise en place de ces mécanismes de réponse à ces divers stress lui permet de rester viable jusqu'à l'intestin grêle où les cellules vont interagir avec les entérocytes. Les mécanismes cellulaires qui soutiennent la traversée de la barrière intestinale ont été étudiés dans le détail. *Listeria monocytogenes* détourne à son profit le fonctionnement normal des cellules. Pour cette raison, elle est devenue un paradigme pour l'étude des interactions entre pathogène et cellules humaines (Cossart & Toledo-Arana, 2008).

3.3.1. Internalisation, multiplication intracellulaire et dissémination de *L. monocytogenes*

Au contact de l'épithélium intestinal, deux protéines de surface de *L. monocytogenes*, codées par *inlAB*, interagissent avec des récepteurs présents à la surface des entérocytes. Ces interactions aboutissent à l'internalisation de la bactérie à l'intérieur de l'entérocyte. L'internalisation se fait en quatre étapes principales (Figure 2a et 2b):

(i) interaction des protéines de surface et des récepteurs. Deux processus ont été décrits. L'un des processus consiste en l'interaction de la protéine de surface Internaline A (InlA) avec les récepteurs E-cadhérine présents sur les cellules intestinales de l'hôte (Mengaud *et al.*, 1996). L'E-cadhérine est une glycoprotéine qui assure la cohésion de l'épithélium. Le second processus fait intervenir la protéine de surface Internaline B (InlB) et le récepteur cellulaire Met (Shen *et al.*, 2000). La protéine Met régule la croissance, la

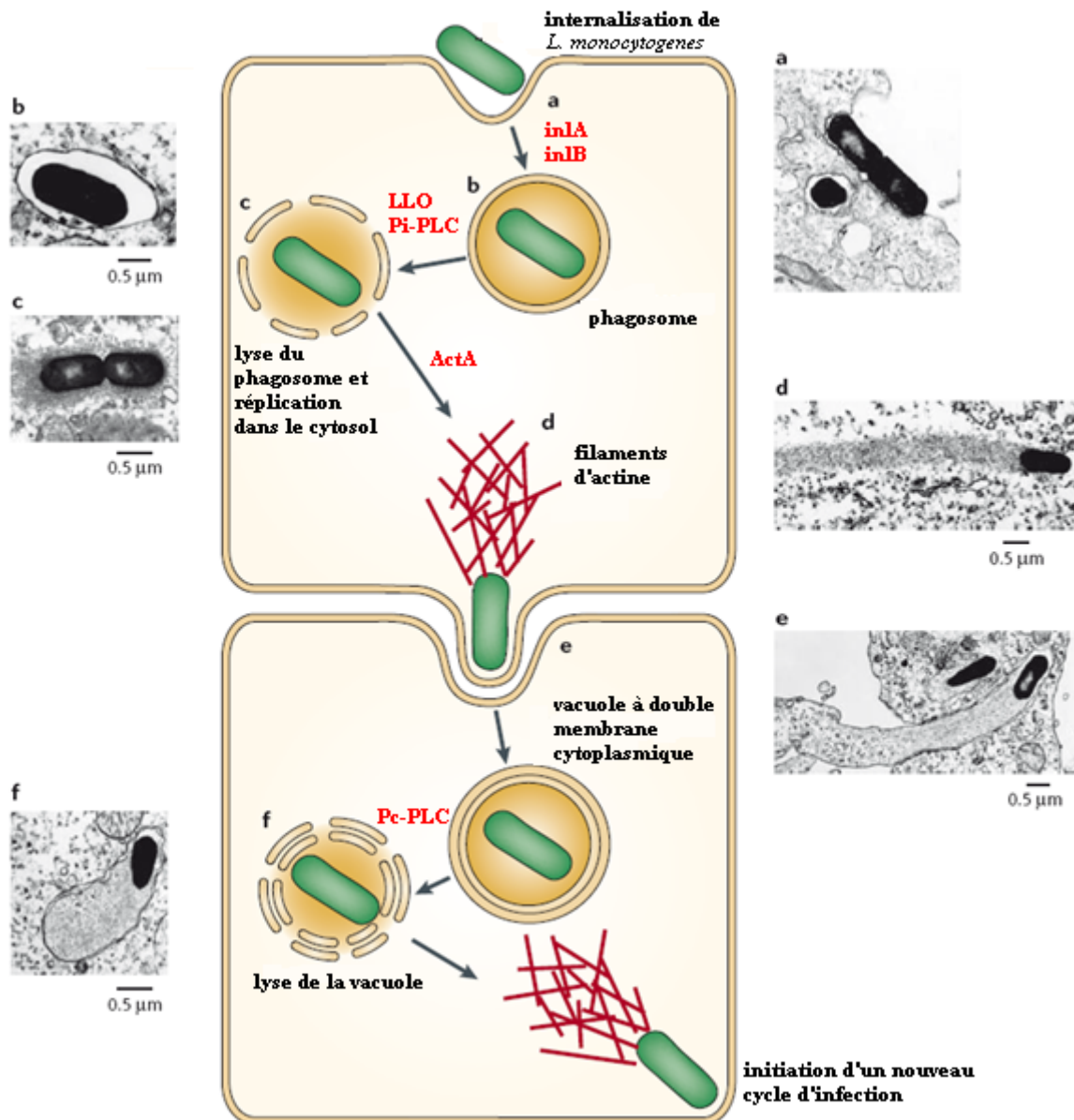


Figure 3. Cycle intracellulaire d'infection des entérocytes par *L. monocytogenes*. (a) Internalisation de *L. monocytogenes* dans un entérocyte sous la dépendance des internalines, (b) Présence de la bactérie dans un phagosome, (c) Lyse de la membrane du phagosome par l'action de la phospholipase *Pi-PLC* et de la toxine *LLO*, (d) Polymérisation de l'actine et mouvement intracellulaire, (e) Propulsion de la bactérie vers une cellule voisine et internalisation de la bactérie dans une vacuole composée d'une double membrane cytoplasmique, (f) *L. monocytogenes* se libère grâce à l'action de la phospholipase *Pc-PLC* et initie un nouveau cycle infectieux. D'après : (Hamon *et al.*, 2006).

mobilité et la morphogénèse des cellules par réarrangement du cytosquelette. L'activation de la protéine Met est induite par les facteurs de croissance des hépatocytes (HGF pour Hepatocyte Growth Factor) (Stella & Comoglio, 1999). Lors d'une infection par *L. monocytogenes*, l'action du HGF est mimée par InlB pour permettre l'interaction de la bactérie avec la cellule.

(ii) modification post traductionnelle de la protéine cible de l'hôte. L'interaction de l'E-cadherine avec InlA induit sa phosphorylation par la protéine Src et son ubiquitination par la protéine Hakai (Bonazzi *et al.*, 2008) alors que l'interaction de Met avec InlB induit son autophosphorylation et le recrutement de la protéine Cbl, ce qui permettrait l'ubiquitination du récepteur Met (Veiga & Cossart, 2005).

(iii) le recrutement de la machinerie d'endocytose par vésicules de clathrines. L'activation des récepteurs E-cadherine et Met induit le recrutement de l'adaptateur des clathrines, Dab 2, puis des clathrines elles-mêmes (Bonazzi *et al.*, 2011). La protéine Hip1R qui interagit à la fois avec les clathrines et le cytosquelette d'actine est ensuite recrutée. De plus, la protéine myosin VI peut se lier à la protéine Hip1R et interagir également avec les filaments d'actine (Bonazzi *et al.*, 2011). D'autres membres de la machinerie d'endocytose entrent ensuite en jeu. La dynamine (impliquée dans la formation des vésicules lors de l'endocytose) recrute la cortactine, un activateur du complexe Arp2/3, qui permet la nucléation et la polymérisation de l'actine (Veiga & Cossart, 2005).

(iv) réarrangement du cytosquelette d'actine. La polymérisation de l'actine induit ensuite le réarrangement du cytosquelette et favorise la fission des vésicules de clathrines à partir de différents compartiments membranaires (Suetsugu, 2009). Ce détournement de la machinerie cellulaire induit l'internalisation du pathogène dans une vacuole dans le cytoplasme de l'entérocyte.

L. monocytogenes se retrouve alors dans l'environnement hostile du compartiment phagosomal caractérisé par un pH bas (pH 4,5-5) (Geisow *et al.*, 1981) et par la présence de composés antimicrobiens (Figure 3b). La libération simultanée d'une hémolysine, la listériolysine O (LLO) et de la phosphatidyl-inositol phospholipase C (Pi-PLC) entraîne la destruction de la membrane du phagosome et la libération de *L. monocytogenes* dans le cytoplasme, milieu qui permet sa multiplication (Figure 3c). La synthèse de la protéine ActA entraîne la polymérisation des filaments d'actine (Figure 3d) et la formation d'une comète d'actine qui permet la mobilité intracellulaire et qui propulse *L. monocytogenes* à travers la

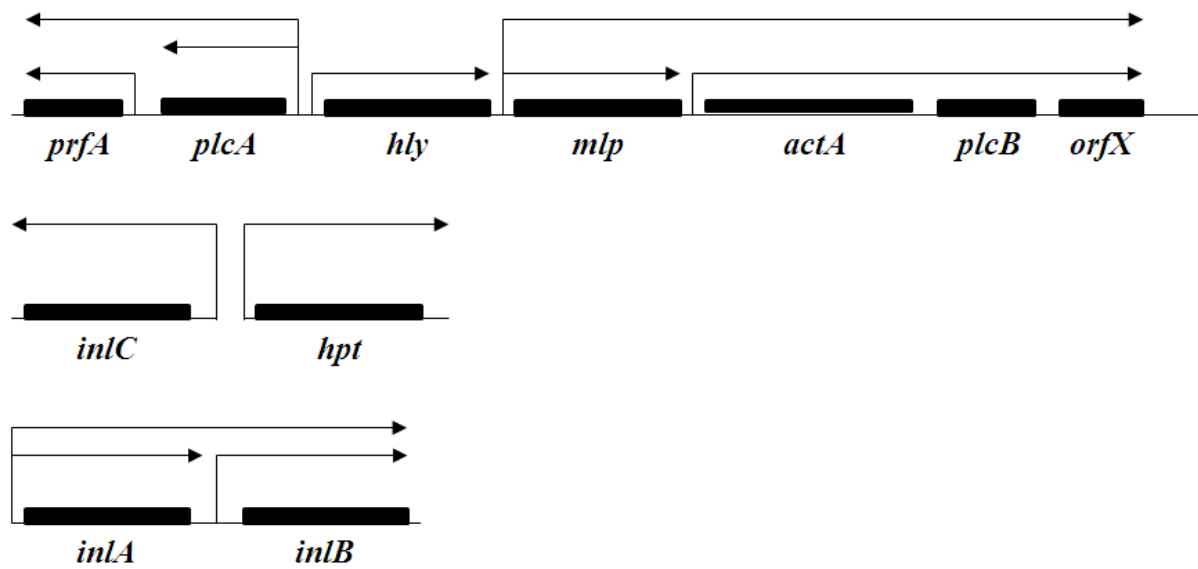


Figure 4. Représentation schématique de l'organisation des principaux gènes qui codent les protéines impliquées dans le cycle infectieux de *L. monocytogenes* chez l'Homme. Ces gènes sont répartis au sein de l'îlot de pathogénécité LIPI-1, de l'opéron *inlAB* et des monocistron *inlC* et *hpt*. D'après : (Roberts & M.Wiedmann, 2003).

membrane de l'entérocyte vers les cellules adjacentes de l'épithélium (Tilney & Portnoy, 1989). Les bactéries se trouvent alors dans une vacuole à double membrane (Figure 3e). L'action de LLO et d'une seconde phospholipase, la phosphatidyl-choline phospholipase C (Pc-PLC) libère la bactérie de cette nouvelle structure (Figure 3f). De proche en proche, ce processus induit la dissémination de la bactérie à l'ensemble de l'épithélium et à la traversée de cette barrière biologique (Dabiri *et al.*, 1990). La majorité des gènes codant les facteurs de virulence nécessaires pour ces différentes étapes de parasitisme intracellulaire chez l'Homme (Scortti *et al.*, 2007) sont répartis au sein de l'îlot de pathogénicité LIPI-1 (Figure 4).

Une fois la barrière intestinale traversée, *L. monocytogenes* est véhiculée par le système lymphatique et sanguin jusqu'au foie, la rate et la vésicule biliaire. Si la réponse immunitaire ne permet pas le contrôle de la réplication de *L. monocytogenes*, le pathogène atteint l'encéphale et, chez la femme enceinte, le fœtus. Les mécanismes cellulaires assurant la traversée de ces deux barrières restent encore mal connus.

3.3.2. Traversée de la barrière hémato-encéphalique

Des résultats expérimentaux suggèrent que *L. monocytogenes* peut envahir directement les cellules endothéliales micro-vasculaires du cerveau grâce à la protéine de surface InlB (Greiffenberg *et al.*, 1998). Un second mécanisme dit « cheval de Troie » a également été mis en évidence. Il implique le recrutement des monocytes et leucocytes infectés par *L. monocytogenes* pour permettre la propagation intracellulaire du pathogène des phagocytes vers les cellules endothéliales (Kim, 2008).

3.3.3. Traversée de la barrière foeto-placentaire

L. monocytogenes semble traverser la barrière foeto-placentaire grâce à l'interaction de la protéine de surface InlA avec les récepteurs E-cadhérine présents sur la couche épithéliale et sur les villosités du placenta (Lecuit *et al.*, 2004). Une autre étude indique cependant que l'action seule de InlA ne serait pas suffisante pour l'invasion de la barrière placentaire par *L. monocytogenes* et que l'action couplée de InlA et InlB est indispensable (Disson *et al.*, 2008).

3.4. Epidémiologie

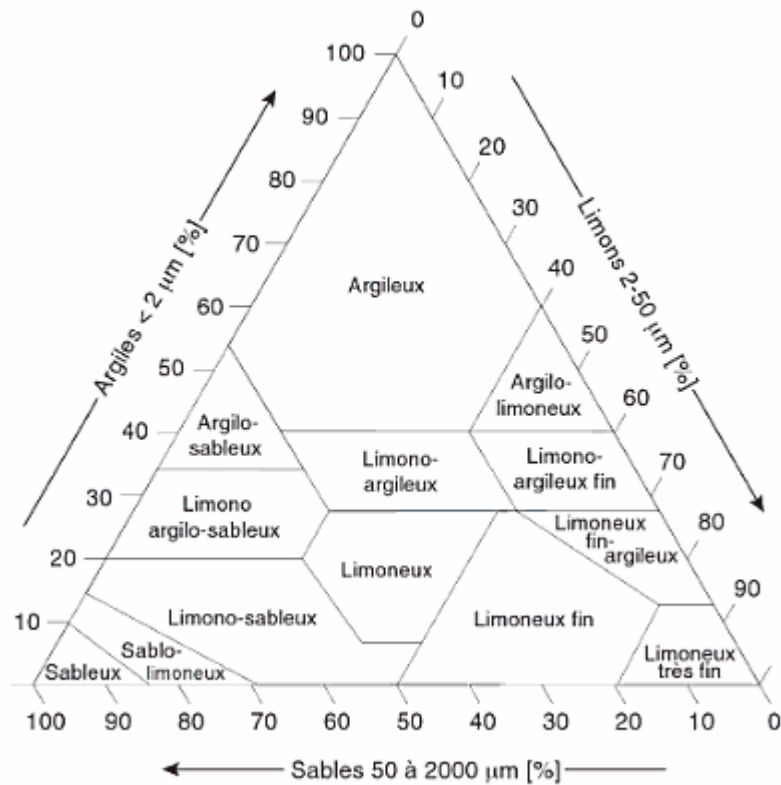
Comme indiqué précédemment, la listériose est une maladie d'origine alimentaire rare mais grave. Même si le taux d'incidence annuel (nombre de cas pour 100 000 habitants) est faible, le nombre d'hospitalisations et de décès sont quant à eux très élevés.

Tableau 3. Comparaison des taux d'incidence (nombre de cas pour 100000 habitants) de diverses maladies d'origine alimentaire ainsi que de la fréquence d'hospitalisation et du taux de mortalité associés dans l'Union Européenne (EFSA & ECDPC, 2013).

Pathogène	Incidence	Fréquence d'hospitalisation (%)	Taux de mortalité (%)
<i>Campylobacter</i>	50,3	47,9	0,04
<i>Salmonella</i>	20,7	45,7	0,12
<i>Yersinia</i>	1,63	55,2	0,02
<i>Listeria</i>	0,32	93,6	12,7

En France, l'incidence de la listériose était en constante diminution jusqu'en 2001 puis s'est stabilisée jusqu'en 2005 (0,35). Depuis, une augmentation de l'incidence a été notée en 2006 (0,46) puis 2007 (0,5) (Goulet *et al.*, 2008). L'incidence s'est stabilisée autour de 0,5 depuis lors. En 2011, l'incidence de la listériose en France était de 0,44 avec un taux de létalité important de l'ordre de 20-30% (INVS, 2011). Des tendances similaires ont été observées dans l'ensemble de l'Union Européenne (EFSA & ECDPC, 2013). Dans l'Union Européenne, le taux d'incidence de cas de listériose était de 0,32 en 2011, avec un taux de mortalité de 12,7 %. Pour comparaison, la même année, l'incidence des infections d'origine alimentaire par *Campylobacter*, *Salmonella* et *Yersinia* était supérieure à celle de *Listeria* mais les cas d'hospitalisation et de décès étaient moins nombreux (Tableau 3) (EFSA & ECDPC, 2013). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'augmentation inattendue des cas de listériose sur deux années consécutives. Le vieillissement de la population et l'augmentation du nombre de personnes dont le système immunitaire est altéré (immunodéprimés, femmes enceintes et nouveaux nés, personnes diabétiques...) pourraient être des facteurs de cette augmentation. De plus, la présence plus fréquente de *L. monocytogenes* à des niveaux de contamination suffisants pour infecter une personne immunodéprimée pourrait être associée à une diminution des teneurs en sel et l'augmentation des dates limites de consommation des aliments (Goulet *et al.*, 2008). Cependant, rien ne permet d'identifier clairement le déterminisme de l'augmentation des cas de listériose. Malgré l'effort constant de maîtrise du risque sanitaire, des phénomènes d'émergence et/ou de réémergence restent possibles voire probables.

(a)



(b)

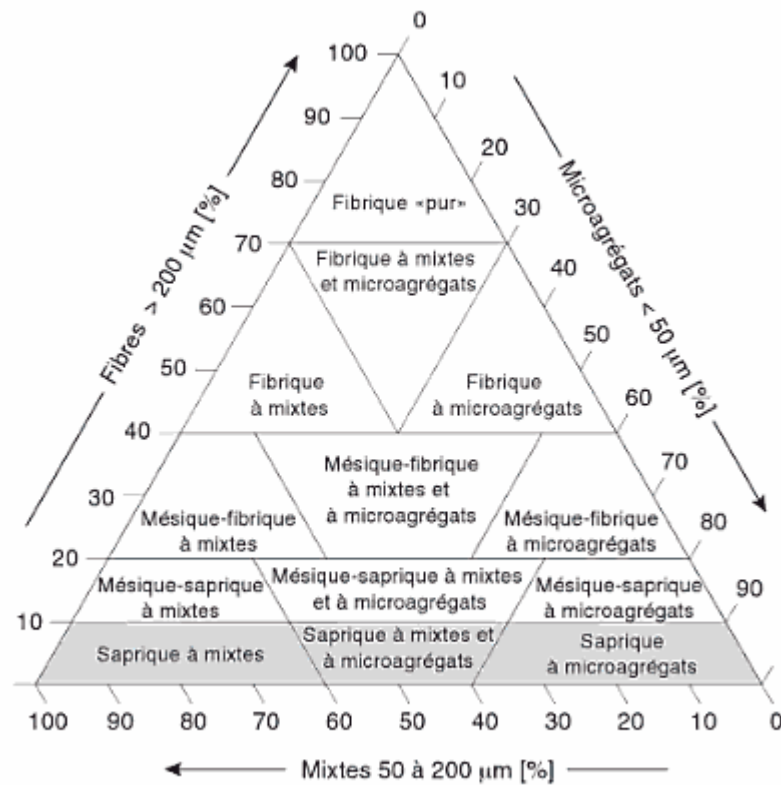


Figure 5. Triangle des textures (a) minérales et (b) organiques permettant de caractériser les sols (Gobat *et al.*, 2010).

Le sol : Un écosystème complexe et hétérogène

Comme développé précédemment, le sol et la rhizosphère sont des réservoirs de *L. monocytogenes*. La présence de *L. monocytogenes* dans le sol peut engendrer des problèmes sanitaires du fait d'un possible transfert vers les plantes cultivées, les animaux et productions animales et l'eau. Dans ce contexte, comprendre l'écologie de *L. monocytogenes* dans le sol est primordial pour prévenir sa dissémination dans l'environnement et les risques sanitaires associés. Cette section abordera les propriétés du sol et l'écologie de *L. monocytogenes* dans cet environnement complexe et hétérogène.

Selon le petit Robert (Edition 2013), le sol est défini comme « la partie superficielle de la croûte terrestre, à l'état naturel ou aménagée pour le séjour de l'homme ». Souvent perçu comme un simple support, le sol est en fait un système écologique complexe qui remplit de multiples fonctions. La définition proposée par la Société Suisse de pédologie met en relief cette dimension du sol : « Le sol est la couche la plus externe, marquée par les êtres vivants, de la croûte terrestre. Il est le siège d'un échange intense de matière et d'énergie entre l'air, l'eau et les roches. Le sol, en tant que partie de l'écosystème, occupe une position clef dans les cycles globaux des matières ». Le sol est le siège de la transformation de la matière organique et constitue un réservoir de matières organiques et minérales, c'est le support de la production des matières premières agricoles destinées à l'alimentation humaine et animale, mais c'est aussi un filtre naturel et un système épurateur de polluants chimiques et biologiques.

1. Une matrice complexe

Le sol est un habitat complexe qui présente des niches écologiques très diverses. A l'interface entre l'air et la roche sous-jacente, le sol est une matrice hétérogène où des gradients apparaissent.

1.1. Texture du sol

La texture est la propriété du sol qui traduit de manière globale sa composition granulométrique. Elle conditionne directement la structure, la porosité et le régime hydrique du sol, et reflète la part respective des constituants minéraux et des constituants organiques. Les triangles des textures minérales et organiques permettent notamment de caractériser les sols suivant la proportion de ces constituants (Figure 5).

Les constituants minéraux issus de la désagrégation physique et de l'altération chimique des roches peuvent être considérés comme le squelette du sol. En fonction de leur taille, ces constituants se répartissent en plusieurs fractions. Les sables grossiers et fins (50-2000 μm) représentent la fraction la plus grossière des constituants minéraux, suivi des limons grossiers et fins (2-50 μm) et des argiles (< 2 μm). La surface des argiles est chargée négativement ; pour cette raison la teneur en argile influence les échanges ioniques et la capacité d'échange cationique (CEC) du sol par fixation des cations. Les argiles servent également de réserve hydrique. En effet, les feuillets d'argile constituent un important réseau permettant la pénétration ou la libération de l'eau. Enfin, les argiles influencent la structure du sol. En fonction des forces de répulsion et d'attraction qui s'exercent entre les particules, les argiles peuvent se présenter sous forme de mélange homogène avec l'eau (état dispersé) ou sous forme d'agrégats (état floculé).

Les constituants organiques, formant l'humus, sont issus de l'accumulation des déchets et sécrétions des êtres vivants ainsi que de la décomposition de la matière organique. Ils représentent une source d'énergie essentielle pour les organismes du sol. La première catégorie de matière organique est la litière. Elle comprend tous les organismes qu'ils soient végétaux, animaux ou microbiens, aériens ou souterrains, ainsi que leurs déchets et les composés émis directement dans le milieu. Les macromolécules représentent la deuxième fraction de la matière organique du sol. La majorité provient du sol (exsudats racinaires, parois cellulaires, cellules ou bois) et dérivent de processus chimiques et biochimiques constituant l'humification. Les principaux types de macromolécules sont les saccharides, parmi lesquels la cellulose et la chitine sont les plus abondants, les lignines, les lipides et les composés azotés. Ces derniers peuvent constituer plus du tiers de la matière organique du sol.

1.2. Complexe argilo-humique

Le complexe argilo-humique ou complexe adsorbant est une matrice organo-minérale qui permet la cohésion des micro-agrégats du sol. A l'échelle moléculaire, la stabilité de ce complexe est assurée par des liaisons chimiques entre les feuillets d'argile et les molécules d'humus. Ces liaisons peuvent se faire *via* :

(i) des ponts calciques. Le complexe humus-calcium-argile est le plus solide des complexes. Le calcium assure des liaisons stables empêchant la minéralisation de l'humus et la dispersion des argiles.

(ii) des ponts constitués d'hydroxyde de fer et d'alumines. Le complexe humus-fer-argile est moins stable que le complexe humus-calcium-argile.

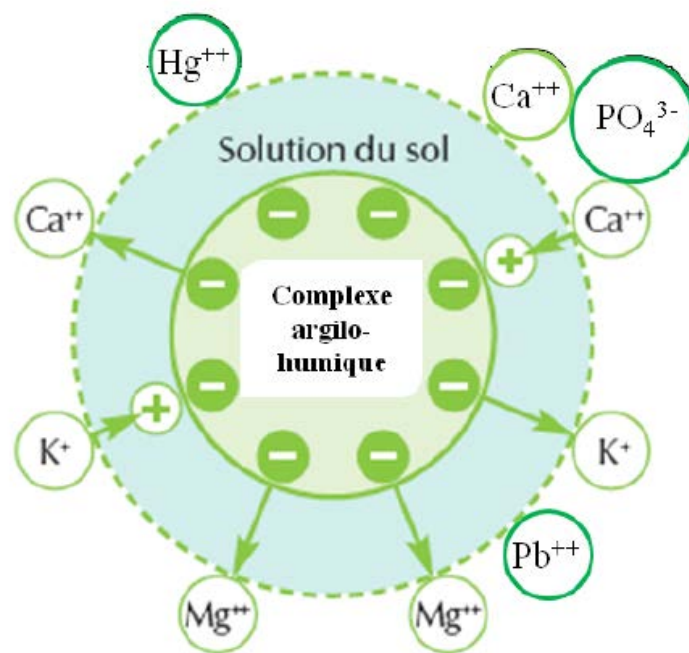


Figure 6. Schématisation du complexe argilo-humique et l'adsorption des cations et groupements anioniques du sol.

(iii) des ponts aluminium.

Les complexes formés permettent la fixation des cations tels que Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ ou Na^+ (Figure 6) qui deviennent ainsi accessibles comme nutriments ou comme fixateurs d'anions ou de groupements anioniques. Cette capacité à fixer les cations du sol a également une importance écotoxicologique. En effet, ces complexes peuvent fixer et donc stabiliser des métaux lourds (Hg^{++} , Pb^{++} ...) qui ne sont alors plus solubles dans l'eau ou dans l'air.

1.3. Solution et eau du sol

La solution du sol est constituée de l'eau et de toutes les substances qui y sont dissoutes. Elle permet la solubilisation des constituants minéraux et organiques ainsi que leur circulation, elle est essentielle à l'activité des microorganismes et des plantes. Elle est aussi l'habitat de nombreux représentants de la microfaune du sol.

Dans le sol, l'eau se répartit en trois catégories définies par le degré de disponibilité pour les organismes. L'eau de gravité, également appelée eau libre, est la forme la plus mobile et disponible. Elle remplit les macroporosités du sol et s'écoule par gravitation. Elle n'est donc présente dans le sol que quelques heures après la fin de la pluie. L'eau utilisable remplit les pores dont le diamètre est compris entre 0,2 et 50 μm et forme des films à la surface des particules. Elle est par définition la source d'eau pour les microorganismes, la faune et les végétaux. Enfin, l'eau inutilisable est contenue dans les pores les plus fins et/ou retenue sous forme de films très minces autour de certains constituants minéraux. Elle est présente dans le sol même à des températures élevées mais est inaccessible pour les organismes.

1.4. Échanges ioniques et capacité d'échange cationique

La concentration en ions dans la solution du sol est en équilibre avec la quantité d'ions fixés par le complexe argilo-humique. En cas d'apport extérieur, le déplacement des ions se fera de la solution du sol vers le complexe et inversement en cas de prélèvement. Cependant, tous les complexes adsorbants ne présentent pas la même capacité à fixer les ions. La capacité d'échange cationique (CEC) représente la quantité de cation que le complexe adsorbant peut retenir à un pH donné. Elle dépend directement de la quantité d'argile et de matière organique ainsi que du pH du sol. Chaque sol possède une CEC spécifique.

1.5. Atmosphère du sol

Dans le sol, l'air occupe les espaces abandonnés par l'eau. Il permet les échanges à l'intérieur du sol mais aussi avec l'air extérieur. La composition de l'atmosphère du sol varie en fonction de la texture, de la teneur en eau et de l'activité des organismes du sol. Suivant la structure du sol (aéré ou compact), les proportions en oxygène et en azote varient respectivement de 0 à 20% et de 78 à 80%. La proportion en gaz carbonique de l'atmosphère du sol est nettement supérieure à celle de l'air (entre 0,2 et 3,5% contre 0,03%) et atteint jusqu'à 10% dans la rhizosphère où les échanges gazeux sont intenses. La teneur en oxygène conditionne certains processus, notamment la respiration aérobie. La respiration des racines, de la microflore aérobie et de la faune entraîne une diminution de l'oxygène et une augmentation du gaz carbonique alors que la fixation d'azote et la dénitrification bactérienne modifient les concentrations en azote (N_2O , NO). Les organismes de la macrofaune et de la mésofaune peuvent se déplacer si l'oxygène se raréfie. Cependant, pour d'autres organismes incapables de se déplacer (végétation) ou pour lesquels les déplacements sont lents (microfaune, microorganismes) éviter une chute de la teneur en oxygène devient difficile.

1.6. pH

En fonction de la nature du sol, le pH peut être compris entre 2 et 10 mais la majorité des sols possède un pH compris entre 4 et 7,5. Des variations importantes de pH peuvent également exister au sein d'un même sol. La dégradation de la matière organique du sol est également dépendante du pH. D'une part, au travers de l'activité microbienne qu'il module, et d'autre part, en modifiant la vitesse de transformation des carbonates.

2. Un réservoir d'organismes

Le sol est un incroyable réservoir de biodiversité. Un gramme de sol peut en effet contenir plusieurs milliers d'espèces différentes (Giller, 1996).

2.1. Faune

L'ensemble des animaux présents dans le sol est regroupé dans la faune du sol. Celle-ci est classée selon la taille et le rôle des organismes.

La microfaune est constituée d'espèces de diamètre inférieur à 0,2 mm telles que les rotifères terrestres, les tardigrades, les nématodes ou les eucaryotes unicellulaires (malgré les fluctuations de la nomenclature, le terme protozoaire sera utilisé de façon générique pour les eucaryotes unicellulaires et il fera référence aux ciliés, flagellés et amibes). L'habitat de

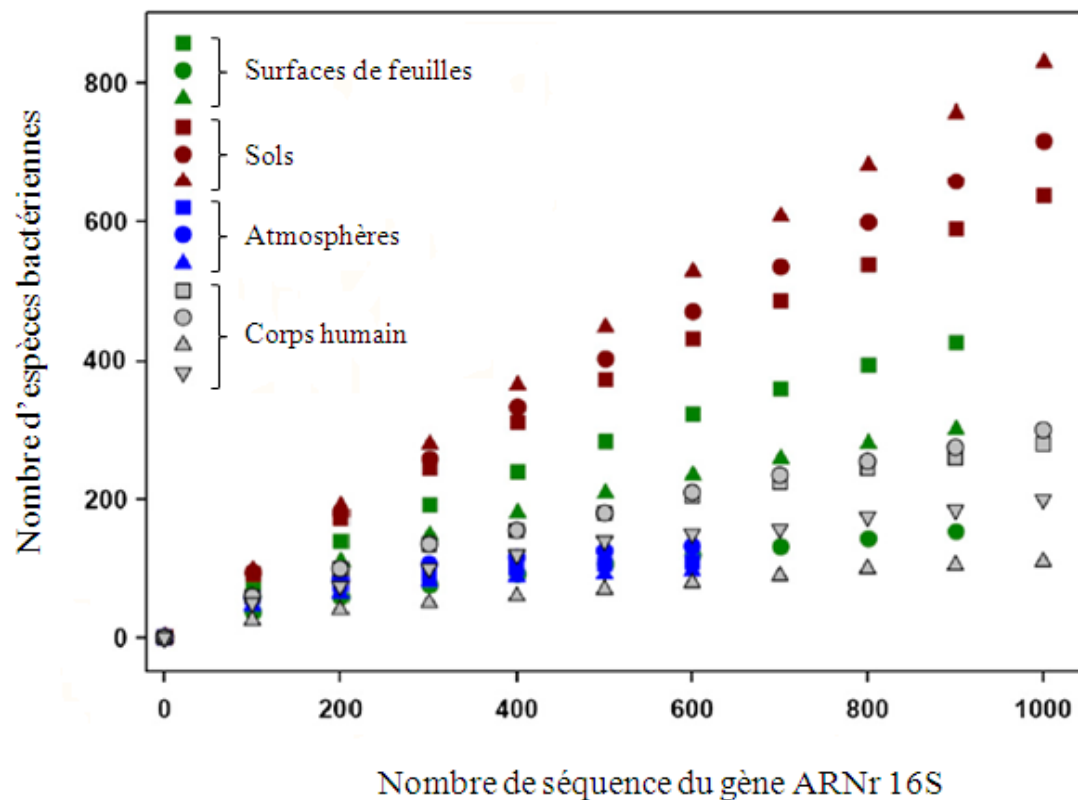


Figure 7. Comparaison de la richesse bactérienne du sol et de divers habitats. L'axe des x représente le nombre de séquence obtenues par échantillon selon l'axe y qui montre le nombre d'espèces bactériennes observées par échantillon. D'après (Fierer & Lennon, 2011).

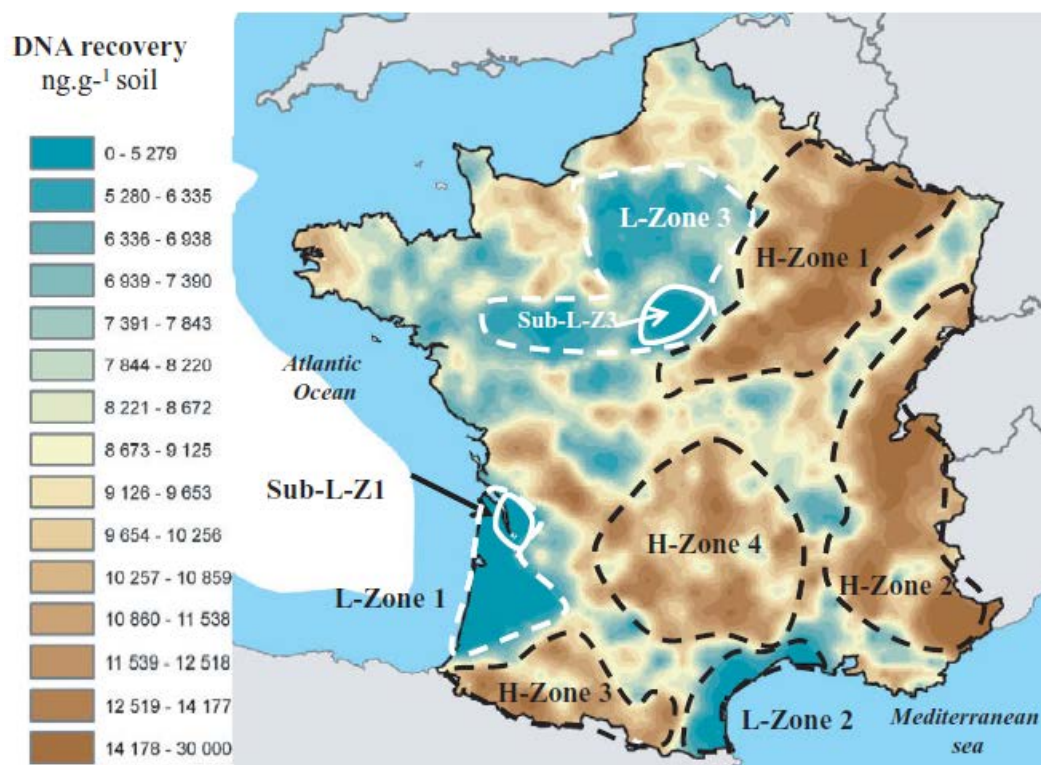


Figure 8. Distribution de la biomasse microbienne sur le territoire Français estimée par la quantité d'ADN extraite par gramme de sol (Dequiedt *et al.*, 2011).

prédilection de ces derniers est le milieu aquatique. Ils sont principalement retrouvés dans les réseaux hydriques du sol. Leur communauté est influencée par le « climate moisture index - CMI », un index de la disponibilité en eau annuel du sol (Bates *et al.*, 2013).

La mésofaune rassemble les organismes entre 0,2 et 4 mm. Les plus représentés sont les acariens et les collemboles. Se retrouvent aussi dans la mésofaune les pseudoscorpions, les protozoaires, les diploures, les petits myriapodes ainsi que des nématodes de plus grande taille.

Enfin, la macrofaune est représentée par les organismes d'une longueur comprise entre 4 et 80 mm. Ce sont les lombrics, des larves d'insectes, des cloportes, des myriapodes, des limaces et des escargots, des araignées ou bien encore des fourmis.

2.2. Microorganismes

2.1.1. Une biomasse microbienne importante

Plusieurs groupes de microorganismes ont été retrouvés dans le sol : les bactéries, les archées, les eumycètes et les algues microscopiques eucaryotes. Les bactéries sont les microorganismes les plus largement représentés, aussi bien en termes d'individus que d'espèces. Par ailleurs, le sol abrite la plus grande richesse de bactéries sur la planète Terre (Figure 7).

L'abondance du sol en microorganismes varie suivant la nature et la localisation des sols (Figure 8). En moyenne, un gramme de sol contiendrait 10^6 à 10^{10} bactéries, 10^7 archées, 10^3 à 10^6 eumycètes, 10^3 à 10^5 algues (Gobat *et al.*, 2010). Les principaux facteurs impactant leur distribution sont les paramètres physico-chimiques et le mode d'occupation des sols (Dequiedt *et al.*, 2011). Les processus microbiens sont par exemple activés par une litière riche en azote et en cellulose mais pauvre en lignine (rapport C/N bas) alors qu'ils sont inhibés par une litière pauvre en azote mais riche en lignine (rapport C/N élevé, > 25-30). Le pH est l'un des paramètres physico-chimiques qui joue un rôle important dans la composition des communautés microbiennes. Il favorise ou non la présence de certains microorganismes suivant leur affinité et leur capacité de tolérance (Hu *et al.*, 2013a). De ce fait, selon les propriétés du sol, l'abondance et la diversité des communautés microbiennes varient.

2.1.2. Diversité et distribution des communautés microbiennes du sol

Méthodologie pour la caractérisation de la diversité

La caractérisation de la diversité des communautés microbiennes est complexe, notamment pour des raisons d'ordre technique. En effet, la majorité des microorganismes du sol n'étant pas cultivable en laboratoire, il est difficile d'estimer leur diversité. Ainsi, des

Tableau 4. Indices couramment utilisés pour caractériser la diversité des communautés.

Indice de diversité	Paramètre estimé	Méthode
Alpha-diversité		
Chao1	Richesse : nombre d'OTU estimé dans la communauté	Estimateur non paramétrique basé sur la distribution des singletons et doubletons
ACE (« abundance based coverage estimator»)	Richesse : nombre d'OTU estimé dans la communauté	Estimateur non paramétrique basé sur la distribution des OTU abondant et rare
Shannon (H')	Diversité des OTU	Proportion d'une espèce par rapport au nombre total d'espèces
Inverse de Simpson (1/D)	Diversité des OTU	Probabilité que deux individus pris de façon aléatoire fasse partie d'une même espèce
Evenness	Distribution des individus au sein de chaque OTU	Diversité des OTU/Nombre d'OTU observé
Béta-diversité		
UniFrac ("unique fraction of branches shared")	Similarité phylogénétique entre communautés	Fraction de branches partagées entre communautés dans un arbre phylogénétique

approches ciblant le génotype des microorganismes ont été mises en place. A l'heure actuelle, le séquençage massif d'un marqueur phylogénétique est la technique la plus couramment utilisée car elle permet de caractériser rapidement, de façon fine et à moindre coût la structure et la composition des communautés microbiennes.

Classiquement, l'analyse de la diversité des communautés microbiennes nécessite l'extraction de l'ADN de la matrice, l'amplification d'un gène d'intérêt par PCR et le séquençage des amplicons générés. Selon le groupe de microorganismes ciblés (bactéries, archées, eumycètes ou algues microscopiques eucaryotes), le gène amplifié par PCR diffère. Néanmoins, le gène codant l'ARNr 16S est traditionnellement utilisé comme marqueur phylogénétique de diversité car il présente plusieurs avantages : (i) il possède des régions hautement conservées nécessaires pour le dessin d'amorces universelles, (ii) mais aussi des régions suffisamment variables pour permettre une identification taxonomique et phylogénétique des individus, (iii) les transferts horizontaux de ce gène entre taxa sont rares et (iv) les bases de données ont accumulé une quantité importante de séquences permettant une identification taxonomique plus sûre.

Les séquences générées sont regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU, « operational taxonomical units »). La diversité microbienne pouvant s'exprimer à différents niveaux taxonomiques (phylum, classe, ordre, famille, espèce), ce concept d'OTU a été développé pour regrouper des organismes phylogénétiquement liés sans préciser leur rang taxonomique. Ces OTU sont ensuite utilisées pour calculer des indices de diversité des communautés microbiennes (Tableau 4). Trois niveaux de diversité sont utilisés: l'alpha-, la bêta- et la gamma-diversité. L'alpha-diversité est définie par des indices de richesse et d'équivalence et permet de rendre compte de la diversité spécifique et/ou phylogénétique et de la distribution des microorganismes au sein d'une communauté alors que la bêta-diversité mesure les variations de composition phylogénétique entre communautés. La gamma-diversité est la résultante de l'alpha- et la bêta-diversité et représente la diversité « totale » à l'échelle du paysage.

Distribution des communautés bactériennes

Etant donné que la nature chimique, la texture et le mode d'occupation des sols influencent l'abondance et la distribution des phyla, il est difficile d'identifier un groupe bactérien qui serait le plus abondant dans le sol (Fierer *et al.*, 2007, Philippot *et al.*, 2010). Toutefois, dans la majorité des études (Dunbar *et al.*, 1999, Liles *et al.*, 2003, Upchurch *et al.*,

2008), les Acidobactéries, les Actinobactéries et les α -Protéobactéries sont les trois phyla les plus largement répandus.

Parmi les paramètres physico-chimiques couramment utilisés pour caractériser un sol (proportion de carbone organique, proportion d'argile, pH, température, teneur en eau et minéralisation du carbone et de l'azote), le taux de minéralisation du carbone est la variable principale pour expliquer l'abondance des différents phyla bactériens (Fierer *et al.*, 2007). Dans les compartiments du sol où le carbone est fortement minéralisé (par exemple la rhizosphère), les β -Proteobactéries et les Bacteroidetes sont plus abondants alors que l'abondance des Acidobactéries est plus faible (Marilley & Aragno, 1999, Fierer *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2007). La composition des communautés bactériennes est également conditionnée par le pH mais selon les études, des différences de relation apparaissent entre l'abondance relative d'un phylum et le pH du sol. Dans l'une d'entre elles, l'augmentation de l'abondance des Acidobactéries est par exemple corrélée à l'alcalinisation des sols (Lauber *et al.*, 2008) alors que dans d'autres études l'augmentation de l'abondance des Acidobactéries est associée à une diminution du pH (Chu *et al.*, 2010, Rousk *et al.*, 2010, Shen *et al.*, 2013). De la même façon, l'alcalinisation des sols se traduit parfois par la diminution des α -Protéobactéries (Lauber *et al.*, 2008, Shen *et al.*, 2013) et parfois par son augmentation (Chu *et al.*, 2010, Rousk *et al.*, 2010).

De façon similaire, le mode d'usage des sols (culture, pâture, forêt, sols amendés ou non) influence l'abondance et l'organisation spatiale des phyla bactériens (Philippot *et al.*, 2010). Différentes études soulignent des différences significatives de composition bactérienne entre les sols de forêt et les sols agricoles, et dans une moindre mesure entre les sols pâturés et les sols en culture (Jangid *et al.*, 2008, Lauber *et al.*, 2008, Upchurch *et al.*, 2008). Les Acidobactéries semblent être plus abondantes dans les sols de forêt et les Actinobactéries dans les sols agricoles. De plus, la distribution des différents phyla dans les prés pâturés est impactée par le bétail (Philippot *et al.*, 2009).

Distribution des communautés d'eumycètes et d'archées

Malgré l'abondance d'eumycètes et d'archées dans le sol, le nombre d'études sur la composition des communautés et leur distribution dans le sol reste limité. De façon globale, les communautés sont beaucoup plus diversifiées que ce qu'il était reconnu jusqu'à présent, ne sont pas distribuées de façon aléatoire, présentent une organisation spatiale et se différencient géographiquement (Green *et al.*, 2004, Bates *et al.*, 2013, Hu *et al.*, 2013b). A faible échelle spatiale, la richesse et la diversité des eumycètes et des archées (en particulier

les *Euryarchaeota*, phylum ubiquiste des archées) pourraient être influencées par les paramètres physico-chimiques du sol tels que le pH (Cao *et al.*, 2012, Hu *et al.*, 2013b), la salinité (Auguet *et al.*, 2010), la teneur en matière organique (Radl *et al.*, 2007) ou bien encore le mode d'usage des sols (Yu *et al.*, 2013)

2.3. Virus

La fraction virale du sol est peu étudiée. Le sol pourrait être favorable à la persistance des virus puisque dans cet environnement ils ne sont pas en contact direct avec la lumière. Les études faisant état de l'écologie des virus dans le sol confirment cette hypothèse et indiquent que le sol héberge une population virale abondante (de l'ordre de 10^9 virus/g de sol sec) et diversifiée (d'après leur profil morphologique) (Williamson *et al.*, 2005, Swanson *et al.*, 2009). De plus, les virus peuvent être rapidement absorbés par les particules du sol. Selon la texture et le pH du sol, la quasi totalité des virus inoculés dans des microcosmes de sols ont pu être absorbés en 15 minutes (Sobsey *et al.*, 1980).

3. Ecologie de *L. monocytogenes* dans le sol

L'introduction de *L. monocytogenes* dans le sol entraîne un remaniement important de l'expression des gènes de la bactérie (Piveteau *et al.*, 2011). Le nombre de gènes dont le taux de transcrit varie significativement augmente graduellement avec le temps d'exposition de *L. monocytogenes* EGD-e au sol. Ce nombre passe de 1237 gènes après 15 minutes de contact à 2230 gènes après 18h. Une grande partie de ces gènes présente un taux de transcrit significativement inférieur. L'analyse par ontologie indique qu'il s'agit de gènes codant des protéines impliquées dans les processus cellulaires, le métabolisme intermédiaire, les voies de signalisation et d'autres fonctions inconnues. Parmi les gènes dont le taux de transcrit est significativement supérieur, la majorité code des protéines nécessaires pour le métabolisme des acides aminés, le transport des protéines (22 des 29 systèmes PTS sont inclus dans cette catégorie) et des enzymes nécessaires pour le catabolisme de sources de carbone complexes telles que la chitine. La capacité à utiliser un large éventail de sources carbonées, notamment des sources complexes telles que la chitine (exosquelette des arthropodes et paroi cellulaire des champignons), est importante pour la survie des bactéries dans l'environnement tellurique où la disponibilité en nutriments peut être faible. La faculté de *L. monocytogenes* d'acquérir et d'utiliser ces sources énergétiques pourrait être critique pour sa vie saprophyte dans le sol.

Tableau 5. Dynamique des populations de *L. monocytogenes* après inoculation de microcosmes de sol (Vivant *et al.*, 2013) (Annexe).

Références	Type de sol	Condition d'incubation	Inoculum (UFC/g)	Dynamique des populations à la fin de la période d'incubation
Sols non stérilisés				
(Welshimer, 1960)	Fertile Argileux	30°C, 295 jours	1.10 ⁸	Décroissance, détecté à la fin de l'étude Approche du niveau zero au bout de 195 jours
(van Renterghem <i>et al.</i> , 1991)	Limono-sableux	15°C, 8 semaines	1.10 ⁵	Détecté par intermittence 6 semaines après incubation
(Dowe <i>et al.</i> , 1997)	Limono-argileux, limono-sableux et sableux	25-30°C, 32 jours	1.10 ² 1.10 ⁶	Détecté à un même niveau quelque soit la taille de l'inoculum (Limono-argileux > limono-sableux > sableux)
(Sidorenko <i>et al.</i> , 2006)	Arable/champ Forêt Urbain	20-22°C, 7 jours	1.10 ²	Stable Non détecté après 2 jours Croissance
(Moshtaghi <i>et al.</i> , 2009)	Limono-argileux	30°C, 35 jours	3.5.10 ⁴ 3.5.10 ⁶	Stable Décroissance, détecté à la fin de l'étude
(McLaughlin <i>et al.</i> , 2011)	Forêt	8°C, 14 jours 25-30°C, 14 jours	1.10 ⁶	Détecté Non détecté à la fin de l'incubation
(Piveteau <i>et al.</i> , 2011)	Limoneux	25°C, 1 an	1.10 ⁵	Croissance
(Locatelli <i>et al.</i> , 2013b)	100 sols*	20°C, 84 jours	1.10 ⁶	Décroissance
Sols stérilisés				
(Dowe <i>et al.</i> , 1997)	Limono-argileux, limono-sableux et sableux	25-30°C, 32 jours	1.10 ² 1.10 ⁶	Détecté à un même niveau quelque soit la taille de l'inoculum
(Moshtaghi <i>et al.</i> , 2009)	Limono-argileux	30°C, 35 jours	3.5.10 ⁴ 3.5.10 ⁶	Stable Décroissance, détecté à la fin de l'étude
(McLaughlin <i>et al.</i> , 2011)	Forêt	25°C, 14 jours	1.10 ⁶	Stable
(Locatelli <i>et al.</i> , 2013b)	9 sols*	20°C, 84 jours	1.10 ⁶	Décroissance dans 6 sols, Croissance (1 à 3 log) dans 3 sols

* type de sols hétéroclites

Les populations de *Listeria* sont capables de survivre dans le sol de quelques semaines à plusieurs mois voire même sur une année entière (Tableau 5) (Welshimer, 1960, van Renterghem *et al.*, 1991, Dowe *et al.*, 1997, Moshtaghi *et al.*, 2009, McLaughlin *et al.*, 2011, Piveteau *et al.*, 2011, Locatelli *et al.*, 2013b). De telles disparités de survie peuvent s'expliquer par les différences de facteurs abiotiques et biotiques rencontrés dans les sols. Ces aspects seront successivement développés dans cette section.

3.1. Paramètres abiotiques affectant la survie de *L. monocytogenes* dans le sol

Le pH est déterminant pour le devenir des populations de *L. monocytogenes* dans le sol (Weis & Seeliger, 1975, McLaughlin *et al.*, 2011, Locatelli *et al.*, 2013b). Les sols acides (pH < 5,5) sont moins favorables à la survie de *L. monocytogenes* que les sols neutres ou basiques. L'humidité est également un paramètre critique (Welshimer, 1960, Weis & Seeliger, 1975). Des différences de survie ont été observées selon le taux d'humidité des sols. La survie de *L. monocytogenes* ne dépasse pas 70 jours dans des microcosmes de sol ayant subi une perte d'humidité (75 à 82% par rapport au taux mesurée au premier jour d'incubation), alors qu'en absence de perte d'eau, la survie est observée jusqu'à 295 jours (Welshimer, 1960). La température impacte également la persistance du pathogène. En général, la survie est favorisée aux températures basses. Expérimentalement, la survie dans des microcosmes de sol est prolongée à 25°C par rapport à une incubation à 30°C (McLaughlin *et al.*, 2011). De même, alors que la population de *L. monocytogenes* survit 43 jours dans des microcosmes de sol incubés à 5°C, la survie est limitée à 21 jours à 15°C et 21°C (Xiuping *et al.*, 2004).

La nature des sols est aussi un paramètre affectant la survie de *L. monocytogenes*. Les sols sableux sont un environnement moins favorable que les sols argileux et les sols limono-argileux (Dowe *et al.*, 1997). Une analyse statistique de la survie de *L. monocytogenes* dans un panel de 100 microcosmes de sol a montré que dans 71% des sols, le pathogène survit au moins 84 jours alors que la détection de *L. monocytogenes* n'a pas excédé 14 jours dans le reste des microcosmes. L'analyse statistique des résultats par partition de variance a permis de mettre en évidence que la survie à long terme est liée à la texture du sol et notamment à la proportion d'argile (Locatelli *et al.*, 2013b).

3.2. Impact de la faune et de la microflore du sol sur la survie de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes est en constante relation avec la faune (micro, méso et macrofaune) et la microflore du sol. Des phénomènes de coopération, de compétition et de prédation peuvent avoir lieu.

3.2.1. Relation de *L. monocytogenes* avec la faune du sol

La microfaune peut être prédatrice ou vecteur de *L. monocytogenes*. Ainsi, le nématode *Caenorhabditis elegans* se nourrit et ingère les cellules de *L. monocytogenes* (Caldwell *et al.*, 2003). Le portage de *L. monocytogenes* dans les intestins du nématode favoriserait la dissémination du pathogène dans le sol. Par la suite, Anderson *et al* et Guha *et al* ont confirmé *in vitro* le rôle de vecteur ou « véhicule » de *C. elegans* pour *L. monocytogenes* (Anderson *et al.*, 2006, Guha *et al.*, 2013). Néanmoins, une accumulation trop importante de *L. monocytogenes* dans les intestins du nématode lui serait fatale (Thomsen *et al.*, 2006). La dissémination de *L. monocytogenes* a également été observée par le nématode *Diploscraper* sp. (Gibbs *et al.*, 2005). Concernant les protozoaires, ils sont de gros consommateurs de bactéries. Selon Stout *et al* (1967), la masse de bactéries ingérées par an et par hectare par les protozoaires serait de 6 tonnes. Ils sont par conséquent en étroite relation avec *L. monocytogenes*. Plusieurs études montrent que les protozoaires du genre *Acanthameba*, fréquemment isolés du sol, comme *A. polyphaga*, *A. castellanii* et *A. lenticulata* sont capables d'éliminer ou d'immobiliser les cellules de *L. monocytogenes* (Akya *et al.*, 2009, Akya *et al.*, 2010, Doyscher *et al.*, 2013). Cependant, *L. monocytogenes* pourrait échapper à *A. castellanii*, voire même se répliquer à l'intérieur du cytoplasme de l'hôte (Zhou *et al.*, 2007). De plus, cette étude montre un effet synergique entre l'amibe et le pathogène puisqu'en présence de l'amibe, les populations de *L. monocytogenes* se maintiennent. *L. monocytogenes* est en mesure de survivre et de se multiplier à l'intérieur du protozoaire cilié *Tetrahymena pyriformis* (Ly & Muller, 1990, Gourabathini *et al.*, 2008, Pushkareva & Ermolaeva, 2010). La dissémination de cellules viables de *L. monocytogenes* passe par la lyse de *T. pyriformis* (Ly & Muller, 1990) ou son enkystement (Pushkareva & Ermolaeva, 2010). A l'instar de cette étude, la survie intracellulaire de *L. monocytogenes* a aussi été observée chez le protozoaire *Glaucoma* sp. (Gourabathini *et al.*, 2008).

Les articles témoignant d'interactions entre *L. monocytogenes* et la méso- et macrofaune sont plus rares. L'infection des larves et des adultes de *Drosophila melanogaster* par *L. monocytogenes* est létale pour l'insecte (Mansfield *et al.*, 2003). D'autres études font état de la présence de *Listeria* sp. dans les intestins de l'isopode *Porcellio scaber* (Lapanje *et al.*, 2010) et du diptère *Anastrepha ludens* (Kuzina *et al.*, 2001) ainsi que dans la flore du coléoptère *Agelastica alni* (Sezen *et al.*, 2004). Ces études permettent de supposer qu'un nombre non négligeable d'organismes de la méso- et macrofaune pourrait être porteur et jouer le rôle de vecteur de *L. monocytogenes*.

3.2.2. Relation de *L. monocytogenes* avec la microflore du sol

La contribution de la microflore dans le devenir de *L. monocytogenes* dans le sol n'est pas clairement déterminée. Plusieurs études ont montré que *L. monocytogenes* est en mesure de croître dans les microcosmes de sol stérilisés par autoclavage ou par irradiation (Dowe *et al.*, 1997, Moshtaghi *et al.*, 2009, McLaughlin *et al.*, 2011) mais pas dans les microcosmes de sol non stérilisés, indiquant que la microflore tellurique influence la dynamique des populations de *L. monocytogenes* dans le sol.

Des phénomènes d'inhibition ont été observés entre des souches bactériennes et fongiques isolées du sol et *L. monocytogenes*. Des substances inhibitrices produites par *Bacillus subtilis* BS15 et *Enterococcus mundtii* contrôlent voire inhibent la croissance de *L. monocytogenes* (Alam *et al.*, 2011, Bigwood *et al.*, 2012). Les filtrats des mycelia de *Penicillium citrinum*, *P. janthinellum*, *P. paxilii*, *P. sclerotiorum*, *P. waksmanii*, *Rhizopus stolonifer*, *Syncephalastrum racemosum* et *Trichoderma reesei* ont aussi montré des activités inhibitrices envers la croissance de *L. monocytogenes* (Takahashi *et al.*, 2008). Cependant, ces études ont été réalisées *in vitro* avec des concentrations élevées de molécules inhibitrices probablement très éloignées des concentrations effectivement présentes dans le sol. Il est alors difficile d'extrapoler *in situ* les conclusions de ces études en raison du caractère hétérogène du sol.

Aucune publication ne fait état, à l'heure actuelle, d'interactions entre *L. monocytogenes* et des archées. Néanmoins, les archées étant présentes à hauteur d'environ 10^7 /g de sol, il est envisageable que de telles interactions existent.

De la perception de l'environnement aux comportements coordonnés : Vers une approche sociomicrobiologique de l'écologie des bactéries

Une caractéristique de la vie est le changement perpétuel. Ainsi, les bactéries ont la capacité d'adapter rapidement et en permanence leur physiologie en fonction des conditions environnementales qu'elles rencontrent. Ce processus requiert une machinerie de détection qui doit être couplée/connectée à la régulation de l'expression des gènes. Les systèmes à deux composants de détection/régulation, les régulateurs transcriptionnels et les systèmes de communication cellulaire sont connus pour être impliqués dans ce processus et permettent l'adaptation physiologique. Plus récemment, le rôle de molécules d'ARN non codants (ARNnc) dans la régulation de l'expression des gènes a été démontré. Ces ARNnc régulent l'expression des gènes en affectant la stabilité des ARN messagers (ARNm) ou en modifiant l'activité de certaines protéines.

En lien avec mes travaux de thèse, cette section est consacrée aux mécanismes permettant l'interaction des bactéries avec leur environnement. La première partie traite de l'importance de la régulation transcriptionnelle dans l'intégration des signaux environnementaux. Dans une deuxième partie, l'état des connaissances sur le rôle régulateur des ARNnc sera présenté. Enfin, la troisième partie s'intéressera à la communication cellulaire et aux comportements coordonnés que les bactéries mettent en place en lien avec les conditions environnementales.

1. Perception et intégration des signaux environnementaux : le couplage de la régulation transcriptionnelle

La synthèse des ARNm est une activité coûteuse pour les bactéries. La production d'ARNm doit donc répondre aux besoins physiologiques immédiats conditionnés par l'environnement. Les régulations transcriptionnelles (initiation de la transcription et mécanisme de terminaison/antiterminaison) et post-transcriptionnelles (stabilité des ARNm et initiation de la traduction) assurent cet ajustement de l'expression des gènes afin de s'adapter au mieux aux conditions environnementales.

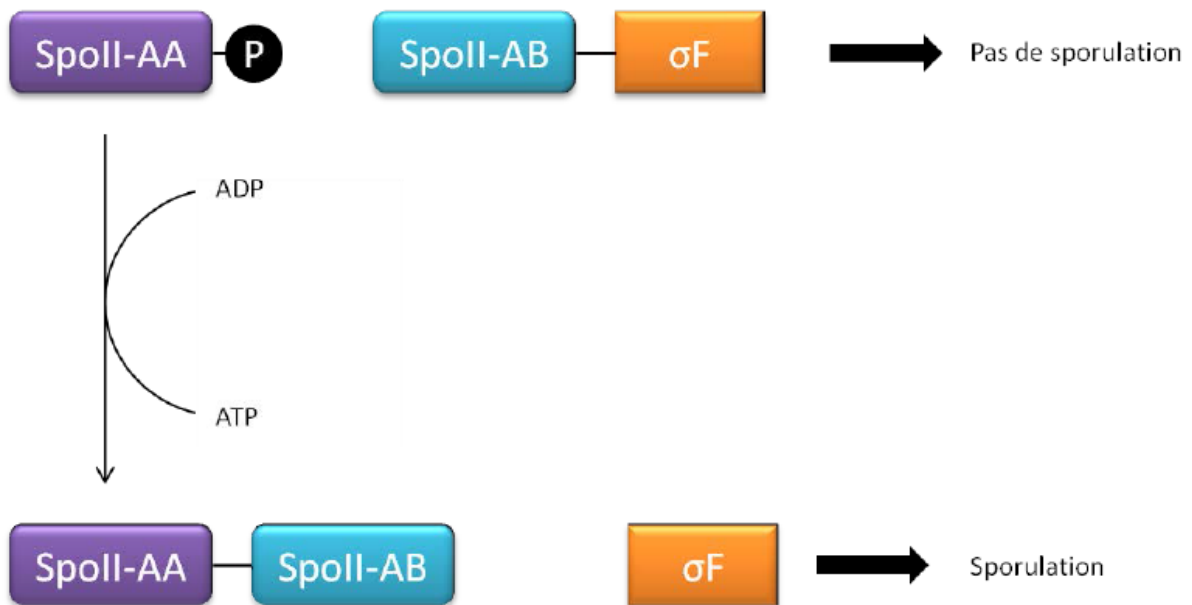


Figure 9. Régulation du facteur Sigma F par les facteurs anti-Sigma SpoIIAB et anti-anti-Sigma SpoIIAA chez *B. subtilis*. La conformation de SpoIIAA phosphorylé empêche son interaction avec SpoIIAB. Le complexe facteur Sigma F/SpoIIAB n'est pas déstabilisé et la sporulation n'est pas induite. La déphosphorylation de SpoIIAA le rend accessible pour SpoIIAB, ce qui libère le facteur Sigma F et induit la sporulation.

1.1. Les acteurs de la régulation de l'initiation de la transcription

Chez les bactéries, l'initiation de la transcription est une étape majeure de la régulation transcriptionnelle. Les facteurs Sigma et les régulateurs transcriptionnels régulent cette étape d'initiation de la transcription. Leur mode de fonctionnement a fait l'objet de plusieurs articles de synthèse (Browning & Busby, 2004, Campbell *et al.*, 2008, Osterberg *et al.*, 2011).

1.1.1. Facteurs sigma

En absence de facteur Sigma, l'interaction de l'ARN polymérase avec l'ADN est peu spécifique et la quantité d'ARNm produite est faible. Les facteurs Sigma sont des protéines qui, en interagissant avec le cœur de l'ARN polymérase, augmentent l'affinité de l'holo-enzyme ainsi formé pour les régions promotrices en amont de certains gènes. Cette interaction protéine/protéine stabilise le complexe d'initiation formé par l'ARN polymérase et sa sous unité facteur Sigma, sur la région promotrice de ces gènes cibles. Les facteurs Sigma sont fonctionnels dans la cellule mais leur activité est régulée par l'action de plusieurs protéines. Le facteur anti-Sigma, en se liant au facteur Sigma, bloque son activité. Lorsque les conditions environnementales nécessitent l'action du facteur Sigma, celui-ci est libéré du complexe facteur Sigma/anti-Sigma grâce à une protéine anti-anti-Sigma qui interagit avec l'anti-Sigma. L'anti-Sigma possède une activité phosphokinase qui catalyse le transfert du groupement phosphate de l'ATP à l'anti-anti-Sigma. La conformation de l'anti-anti-Sigma phosphorylé empêche son interaction avec l'anti-Sigma et le complexe facteur Sigma/anti-Sigma n'est alors pas déstabilisé (Hughes & Mathee, 1998). Lors d'un stress environnemental, l'activité d'une phosphatase induit la déphosphorylation de l'anti-anti-Sigma, ce qui le rend disponible pour interagir avec l'anti-Sigma. Le complexe facteur Sigma/anti-Sigma est ainsi déstabilisé et le facteur Sigma libéré. Par exemple, chez *B. subtilis*, la transcription des gènes liés à la sporulation est sous le contrôle du facteur σ^F . La liaison de l'anti-Sigma SpoIIAB avec le facteur σ^F bloque l'activité de ce dernier, ce qui empêche l'initiation de la transcription des gènes cibles du facteur σ^F . Le facteur anti-Sigma SpoIIAB interagit avec un troisième facteur anti-anti-Sigma appelé SpoIIAA, lorsque ce dernier est sous sa forme non phosphorylée. La liaison de l'anti-Sigma SpoIIAB avec l'anti-anti-Sigma SpoIIAA bloque l'effet inhibiteur de SpoIIAB sur le facteur σ^F et déclenche alors la sporulation (Figure 9) (Duncan & Losick, 1993, Min *et al.*, 1993, Najafi *et al.*, 1995, Masuda *et al.*, 2004).

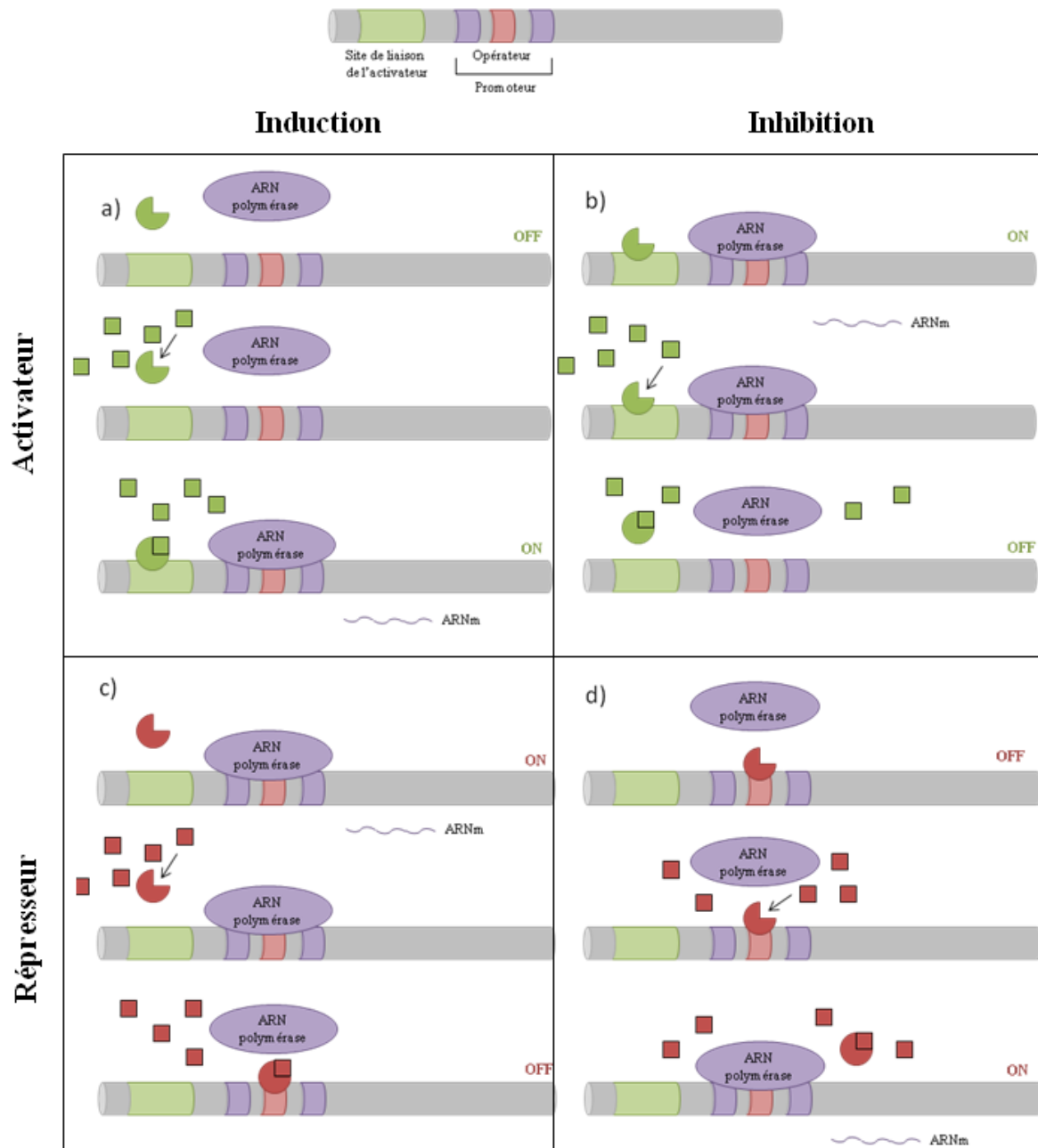


Figure 10. Modes d'actions des régulateurs transcriptionnels activateurs (a, b) et répresseurs (c, d). a) Lorsque le métabolite spécifique est présent, ce dernier se lie au site de fixation de l'activateur qui passe dans sa conformation « ON » et donc se lie à l'ADN ; le recrutement de l'ARN polymérase est favorisé, la transcription est stimulée. b) L'action de l'activateur est annulée en présence du métabolite spécifique. c) Le répresseur est activé en présence de son métabolite spécifique. Le site de fixation de l'ARN polymérase n'est plus disponible. d) La fixation du métabolite spécifique sur le répresseur lève l'action inhibitrice en diminuant l'affinité du répresseur pour la séquence d'ADN. L'ADN devient disponible pour l'ARN polymérase. D'après : (Watson *et al.*, 2009).

1.1.2. Régulateurs transcriptionnels

Les régulateurs transcriptionnels sont des protéines qui peuvent stimuler (activateur) ou réprimer (répresseur) l'initiation de la synthèse des ARNm en favorisant ou en empêchant l'assemblage du complexe de l'initiation. Certains régulateurs peuvent aussi bien agir comme activateur que comme répresseur (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2000). Leur activité régulatrice est liée à la présence de deux sites de fixation sur la protéine.

Tout d'abord, les régulateurs transcriptionnels possèdent un site de fixation à des régions spécifiques de l'ADN. Cette fixation est assurée par des domaines DBD (DNA-binding domain). Les protéines régulatrices sont classées en plusieurs familles en fonction de la nature de ces domaines DBD. Le domaine « hélice-tour-hélice » est le plus courant chez les bactéries. Ce domaine est composé de deux hélices α liées entre elles par une courte séquence d'acides aminés. L'une des hélices contribue à la reconnaissance de la séquence de liaison sur l'ADN. Elle s'insère dans le grand sillon, ce qui permet aux acides aminés de la face externe d'interagir avec les paires de bases. L'autre hélice stabilise le complexe formé. D'autres domaines, moins communs chez les bactéries, sont appelés « domaine en doigt de zinc » ou « glissière à leucine ».

Certains régulateurs transcriptionnels présentent également un second site de fixation spécifique de métabolites de diverse nature, appelés inducteurs ou co-represseurs. Cette interaction du régulateur avec son métabolite spécifique modifie l'activité de la protéine. En effet, la liaison du métabolite sur le site de fixation spécifique modifie la structure tridimensionnelle des domaines DBD. Ce changement de conformation augmente l'affinité du régulateur pour la région promotrice (Figure 10a) ou alors diminue la stabilité de l'interaction entre le régulateur et l'ADN et donc entraîne son détachement (Figure 10b). Au même titre, la liaison du répresseur avec son métabolite spécifique entraîne une interaction stable du répresseur avec la séquence d'ADN (Figure 10c) ou une diminution de l'affinité du répresseur pour la région promotrice (Figure 10d). Ces métabolites sont autant de signaux environnementaux qui permettent de coupler l'expression des gènes aux conditions de l'environnement. La régulation de l'opéron *lacZYA* chez *E. coli* est le cas d'école du fonctionnement des régulateurs transcriptionnels (Jacob & Monod, 1961). L'opéron *lac* permet à *E. coli* d'utiliser le lactose comme source de carbone en produisant des enzymes β -galactosidase, lactose perméase et transacétylase. Toutefois, la production de ces enzymes est inutile quand le lactose est absent ou si une source de carbone plus facilement exploitable, comme par exemple le glucose, est disponible. Ainsi, l'expression de l'opéron

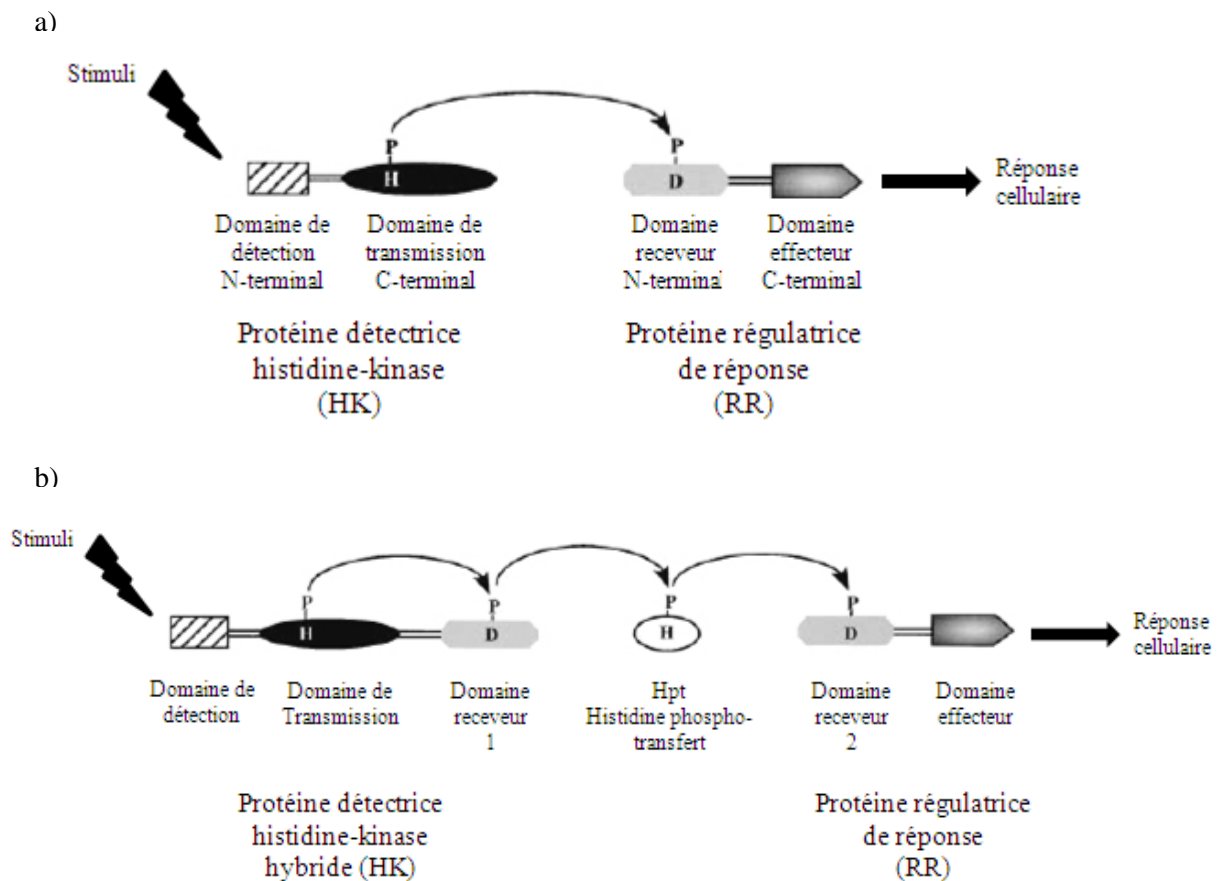


Figure 11. Système à deux composants a) classique constitué d'une protéine détectrice et d'une protéine régulatrice et b) constitué d'un phospho-relais multiple. D'après : (Hutchison & Kieber, 2002).

lactose est régulée par deux protéines régulatrices, le répresseur LacI et la protéine CRP pour *Cyclic AMP Receptor Protein* (Müller-Hill, 1996). Dans un milieu sans lactose, le répresseur LacI se lie à l'opérateur de l'opéron *lacZYA*. L'initiation de la transcription de l'opéron est alors inhibée et la production des enzymes reste limitée (Kuo *et al.*, 2003). A l'inverse, lorsque le lactose est présent dans le milieu extracellulaire, il pénètre à l'intérieur de la cellule. L'allolactose, un des isomère du lactose, en se liant au répresseur modifie la conformation du répresseur et entraîne une diminution de son affinité pour l'opérateur de l'opéron *lacZYA*. L'ARN polymérase peut alors accéder à l'opérateur et assurer la transcription des gènes de l'opéron *lacZYA* et les enzymes nécessaires au métabolisme du lactose sont synthétisées (Kuo *et al.*, 2003). De plus, en absence de glucose, la transcription de l'opéron est considérablement augmentée par l'action de la protéine CRP. En effet, lorsque le glucose est absent, la concentration d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) est élevée. L'AMPC forme un complexe avec la protéine activatrice qui favorise l'assemblage du complexe de l'initiation (Ebright, 1993). La production de β -galactosidase augmente de manière significative. L'hydrolyse du lactose devient possible.

Les métabolites ne sont pas les seuls facteurs pouvant influencer l'activité des régulateurs. La stabilité de certains régulateurs et les facteurs influençant leur stabilité (par exemple température) peuvent déterminer leur activité. Pour d'autres, l'état de phosphorylation de la protéine détermine son affinité pour l'ADN. C'est le cas des régulateurs de réponse qui interviennent dans le fonctionnement des systèmes à deux composants.

1.1.3. Le cas particulier des systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants de détection/régulation permettent aux bactéries de percevoir et répondre aux changements des conditions physico-chimiques et biotiques de l'environnement. Ces systèmes sont également retrouvés chez les Archées (Galperin *et al.*, 2001) et chez certains eucaryotes (eumycètes, plantes et eucaryotes unicellulaires : ciliés, amibes et flagellés) (Schaller *et al.*, 2011).

Comme leur nom l'indique, les systèmes à deux composants sont constitués de deux entités, une protéine détectrice senseur histidine-kinase (HK) et une protéine régulatrice régulateur de réponse (RR). Dans son schéma classique, le système à deux composants permet de convertir l'information détectée à l'extérieur de la cellule en signal intracellulaire grâce au transfert d'un groupement phosphate entre le senseur membranaire et le régulateur cytoplasmique (Figure 11a). Les deux protéines sont constituées d'au moins deux domaines

Tableau 6. Acteurs de la régulation de l'initiation de la transcription dont la fonction a été identifiée et décrite chez *L. monocytogenes*.

Protéines	Fonctions biologiques régulées	Références
Facteurs Sigma		
σA	Expression des gènes dits de « ménage »	(Haldenwang, 1995)
σB	Réponse aux stress	(Becker <i>et al.</i> , 1998, Wiedmann <i>et al.</i> , 1998, Becker <i>et al.</i> , 2000, Ferreira <i>et al.</i> , 2001, Wemekamp-Kamphuis <i>et al.</i> , 2004, Chaturongakul & Boor, 2006, Shin <i>et al.</i> , 2010a, Shin <i>et al.</i> , 2010b, van der Veen & Abee, 2010b, Lee <i>et al.</i> , 2013)
σC	Réponse au stress thermique	(Zhang <i>et al.</i> , 2005, Chan <i>et al.</i> , 2008)
σH	Réponse au stress alcalin et nutritif	(Rea <i>et al.</i> , 2004)
σL	Systèmes PTS Réponse au stress thermique, osmotique, acide et alcoolique Résistance aux antibiotiques	(Robichon <i>et al.</i> , 1997, Dalet <i>et al.</i> , 2001, Raimann <i>et al.</i> , 2009, Mattila <i>et al.</i> , 2012)
Régulateurs transcriptionnels ou régulateurs		
CodY	Réponse au stress nutritif	(Bennett <i>et al.</i> , 2007, Stenz <i>et al.</i> , 2011, Lobel <i>et al.</i> , 2012)
CcpA	Répression catabolique	(Behari & Youngman, 1998a)
Lmo2128	Inducteur catabolique	(Gopal <i>et al.</i> , 2010)
Lmo0753	Réponse au stress nutritif	(Salazar <i>et al.</i> , 2013)
ArgR	Induction du système ADI	(Ryan <i>et al.</i> , 2009)
Lmo0501	Réponse au stress acide et osmotique Croissance à basse température	(Michel <i>et al.</i> , 2011)
GltC	Réponse au stress oxydatif	(Huang <i>et al.</i> , 2013)
PrfA	Réponse au stress thermique	(Johansson <i>et al.</i> , 2002, Scortti <i>et al.</i> , 2007, Piveteau <i>et al.</i> , 2011)
CtsR	Réponse au stress thermique	(Nair <i>et al.</i> , 2000, Ringus <i>et al.</i> , 2012, Liu <i>et al.</i> , 2013)
HrcA	Réponse au stress thermique	(Hu <i>et al.</i> , 2007a, van der Veen & Abee, 2010a)
MogR	Régulation de la motilité	(Gründling <i>et al.</i> , 2004)
GmaR	Régulation de la motilité	(Kamp & Higgins, 2009, Kamp & Higgins, 2011)
LadR	Répresseur de pompe à efflux	(Mata <i>et al.</i> , 2000, Huillet <i>et al.</i> , 2006)
Fur	Réponse aux ions métalliques	(Ledala <i>et al.</i> , 2010)
PerR	Réponse aux ions métalliques	(Rea <i>et al.</i> , 2005, Ledala <i>et al.</i> , 2010)
ZurR	Réponse aux ions métalliques	(Dowd <i>et al.</i> , 2012)
LexA	Répression du système SOS	(van der Veen <i>et al.</i> , 2010)
Lmo0958	Recyclage de carbohydrates	(Popowska <i>et al.</i> , 2012)
BvrA	Répression de la bêta-glucosidase	(Brehm <i>et al.</i> , 1999)

distincts. La protéine HK possède un domaine N-terminal qui interagit avec un stimulus spécifique (molécules signal, stimuli physiques ou chimiques). L'interaction avec le stimulus induit un changement de conformation et l'activation de l'auto-phosphorylation du domaine C-terminal de la protéine. Le groupe phosphoryl est ensuite transféré au domaine receveur de la protéine RR par une cascade de phosphorylation qui entraîne l'activation du régulateur. Le domaine C-terminal de la protéine RR est la région régulatrice qui interagit avec l'ADN ou avec d'autres protéines régulatrices et qui, par conséquent, est responsable de la modification de l'expression des gènes cibles.

Une autre version des systèmes à deux composants consiste en un phospho-transfert multiple connu sous le nom de phospho-relais. Dans ce système, le module histidine phosphotransfère (Hpt) n'est pas porté par le senseur mais se retrouve sous la forme de protéines indépendantes (Bertrand *et al.*, 2011). Ce système nécessite donc un nombre de modules ainsi qu'un nombre d'étapes plus importants. Ils utilisent trois étapes de transfert (Figure 11b). Par exemple, le phospho-relais RcsCDB/AF d'*E. coli* est constitué d'un senseur RcsC, de l'intermédiaire de phosphorylation RcsD et du régulateur de réponse RcsB (Castanie-Cornet *et al.*, 2007).

Ce système apporte vraisemblablement un avantage évolutif par rapport aux systèmes à deux composants classique en apportant plus de flexibilité dans la voie de signalisation. En effet, ce système permet plusieurs voies d'entrée et de sorties de l'information dans le système.

1.2. La régulation de l'initiation de la transcription chez *L. monocytogenes*

1.2.1. Facteurs Sigma chez *L. monocytogenes*

Cinq facteurs Sigma ont été identifiés chez *L. monocytogenes* (Glaser *et al.*, 2001). Comme toutes les bactéries, *L. monocytogenes* possède un facteur σA qui participe à la transcription de la majorité des gènes. Ce facteur Sigma permet de garder l'essentiel des gènes et des voies métaboliques opérationnels (Gruber & Gross, 2003).

Se retrouvent également chez *L. monocytogenes*, le facteur σB qui a fait l'objet d'une attention considérable ces dernières années ainsi que les facteurs σC , H et L. Contrairement au facteur σA , ces facteurs Sigma sont activés de façon spécifique en fonction des conditions environnementales (Tableau 6).

Régulateurs de réponse des systèmes à deux composants

AgrA	Communication cellulaire Adhésion Formation de biofilm Virulence	(Autret <i>et al.</i> , 2003, Rieu <i>et al.</i> , 2007, Riedel <i>et al.</i> , 2009)
CheY	Chimiotactisme, mobilité	(Flanary <i>et al.</i> , 1999, Williams <i>et al.</i> , 2005)
LiaR	Résistance aux antibactériens et antibiotiques	(Collins <i>et al.</i> , 2012)
Lmo1172	Tolérance au stress thermique	(Chan <i>et al.</i> , 2008)
LisR	Tolérance au stress (éthanol, faible pH) Résistance aux antibiotiques Virulence	(Cotter <i>et al.</i> , 1999, Cotter <i>et al.</i> , 2002)
VirR	Virulence Tolérance au stress (éthanol) par modification de la composition de l'enveloppe cellulaire	(Mandin <i>et al.</i> , 2005, Williams <i>et al.</i> , 2005)
ResD	Tolérance au stress (éthanol) par modification de la composition de l'enveloppe cellulaire	(Williams <i>et al.</i> , 2005)
CesR	Résistance aux antibiotiques	(Kallipolitis <i>et al.</i> , 2003)
PhoP	Tolérance au stress (éthanol) par modification de la composition de l'enveloppe cellulaire	(Williams <i>et al.</i> , 2005)
DegU	Mobilité Virulence	(Knudsen <i>et al.</i> , 2004, Williams <i>et al.</i> , 2005)
KdpE	Résistance au stress osmotique et thermique	(Brondsted <i>et al.</i> , 2003)

Le facteur σB joue un rôle central dans la réponse aux stress que *L. monocytogenes* peut rencontrer dans les environnements naturels (sol, plante) et anthropisés (industries agroalimentaires): stress énergétique, osmotique, thermique, alcoolique, acide, oxydatif ou bien encore antibiotique. Des approches de génétique inverse ont permis de mettre en évidence que le facteur σB est nécessaire pour l'accumulation et l'utilisation de bétaine et de carnitine comme cryo- et/ou osmoprotecteurs (Becker *et al.*, 1998, Becker *et al.*, 2000). De plus, les souches mutantes présentent une sensibilité accrue à un pH bas (pH 2,5) (Wiedmann *et al.*, 1998, Ferreira *et al.*, 2001, Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004), à l'oxydation (oxydant hydroperoxyde de cumène) (Ferreira *et al.*, 2001), à une privation de source énergétique (Ferreira *et al.*, 2001) et aux désinfectants de surface utilisés dans les industries agroalimentaires (chlorure de benzalkonium et acide peracétique) (van der Veen & Abee, 2010a). Le facteur σB serait également impliqué dans la résistance aux antibiotiques (notamment à la vancomycine) en régulant l'expression de protéines nécessaires au maintien de l'intégrité des parois cellulaires (Shin *et al.*, 2010b) et dans la formation de biofilms (van der Veen & Abee, 2010a). Il est aussi nécessaire pour l'adaptation de *L. monocytogenes* au sol et joue un rôle dans la persistance des populations dans cet environnement (Gorski *et al.*, 2011). De plus, le rôle du facteur σB a été largement décrit lors de l'adaptation de *L. monocytogenes* aux divers stress rencontrés chez l'Hôte et au cours de la vie intracellulaire. Il est notamment responsable de la transcription de gènes (*gad*, *opuCA*, *bsh* ou *bile*) codant des protéines impliquées dans la survie de *L. monocytogenes* au cours de la digestion (Fraser *et al.*, 2003, Kazmierczak *et al.*, 2003, de las Heras *et al.*, 2011, Mujahid *et al.*, 2013b). Enfin, le facteur σB a été impliqué dans la production de vésicules membranaires extracellulaires qui pourraient contribuer à l'infection de l'hôte et à la protection de *L. monocytogenes* (Lee *et al.*, 2013).

Le facteur σB a donc une action globale sur la physiologie de *L. monocytogenes*. Ainsi, de nombreux gènes sont sous le contrôle du facteur σB . Les derniers résultats publiés font état de plus d'une centaine de gènes positivement ou négativement régulés par le facteur σB (Kazmierczak *et al.*, 2003, Hain *et al.*, 2008, Raengpradub *et al.*, 2008, Oliver *et al.*, 2009, Ollinger *et al.*, 2009, Oliver *et al.*, 2010). En 2013, une méta-analyse combinant des données de puces à ADN et de RNA-seq a déterminé 134 gènes sous le contrôle du facteur σB (Mujahid *et al.*, 2013b). Comme indiqué précédemment, l'activité du facteur σB de *L. monocytogenes* est régulée par le facteur anti-Sigma RsbW, une protéine anti-anti-Sigma RsbV antagoniste de la protéine RsbW et une sérine phosphatase RsbU (Shin *et al.*, 2010a).

L'action du facteur σ^C serait quant à elle restreinte à l'adaptation de *L. monocytogenes* aux stress thermiques. Une souche ayant une mutation inactivant σ^C présente en effet une résistance similaire à la souche parentale en présence d'une forte concentration saline, d'un pH bas, d'une faible température et d'éthanol mais est significativement plus sensible à une température élevée de 60°C (Zhang *et al.*, 2005). Par ailleurs, une autre étude montre un rôle important du facteur σ^C dans l'adaptation et la croissance de *L. monocytogenes* aux températures de réfrigération (Chan *et al.*, 2008b).

Pour ce qui est du facteur σ^H , un défaut de survie a été observé pour le mutant *sigH* dans un milieu minimum et dans un milieu alcalin mais pas dans un milieu acide (Rea *et al.*, 2004) ni dans un milieu réfrigéré à 4°C (Chan *et al.*, 2008b), ce qui laisse présumer le rôle central du facteur σ^H dans l'adaptation de *L. monocytogenes* lors de stress nutritif, alcalin et froid.

Enfin, une étude a démontré que le facteur σ^L est nécessaire à la croissance de *L. monocytogenes* en présence de stress associés aux mesures de préservation des aliments comme les températures de réfrigération, l'addition d'acide organique ou la présence de fortes concentrations en sel (Raimann *et al.*, 2009). Le facteur σ^L pourrait aussi apporter une certaine résistance aux antibiotiques utilisés lors du traitement des listérioses (Mattila *et al.*, 2012) et à un peptide antibactérien produit par *Leuconostoc mesenteroides* (Robichon *et al.*, 1997). De plus, une analyse réalisée *in silico* suggère que le facteur σ^L pourrait contrôler l'expression de différents systèmes PTS (Dalet *et al.*, 2001, Arous *et al.*, 2004), dont *mptACD* qui code le principal transporteur de glucose de *L. monocytogenes* (Vu-Khac & Miller, 2009). Ceci a été confirmé par la suite par une analyse de transcriptomique différentielle. Les résultats montrent que l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates est modulée par le facteur σ^L (Arous *et al.*, 2004). De la même façon, des protéines de fonctions cellulaires diverses, telles que le transport des nutriments, le métabolisme énergétique, la synthèse de l'enveloppe cellulaire ou bien encore la motilité, sont codées par des gènes sous le contrôle du facteur σ^L (Mattila *et al.*, 2012).

1.2.2. Régulateurs transcriptionnels chez *L. monocytogenes*

En octobre 2013, 24 génomes assemblés et annotés de *L. monocytogenes* étaient disponibles (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi?>). La comparaison *in silico* du contenu en groupe de gènes orthologues des génomes de *Listeria* et des Firmicutes indique une richesse des bactéries du genre *Listeria* en régulateurs transcriptionnels, ce qui pourrait

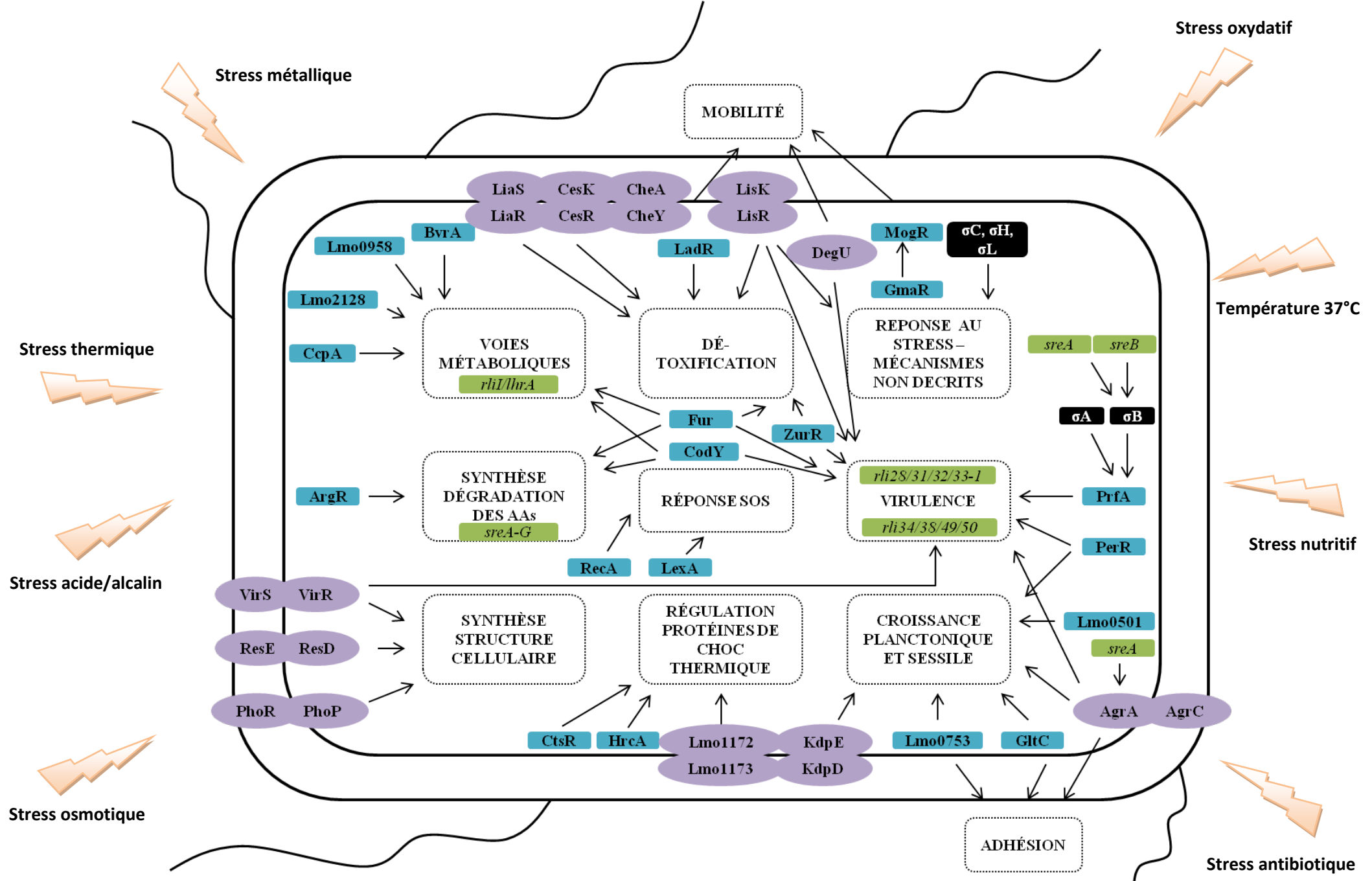


Figure 12. Régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle connues chez *L. monocytogenes*. Les régulateurs transcriptionnels (excepté ceux appartenant aux systèmes à deux composants) sont représentés par des carrés bleus, les systèmes à deux composants (senseur/régulateur) par des ellipses violettes, les facteurs Sigma par des carrés noirs et les ARN non codants par des carrés verts.

faciliter l'adaptation de *L. monocytogenes* à des environnements variés (Glaser *et al.*, 2001, Wurtzel *et al.*, 2012). Parmi les 209 régulateurs identifiés, 20 ont été décrits chez *L. monocytogenes*. Leurs fonctions putatives, exposées dans le Tableau 6, montrent l'importance des régulateurs transcriptionnels dans l'adaptation et la résistance de *L. monocytogenes* aux changements environnementaux.

Les régulateurs transcriptionnels, décrits chez *L. monocytogenes*, ajustent les niveaux d'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les voies métaboliques, la synthèse et la dégradation des acides aminés, la synthèse de la structure cellulaire, la croissance planctonique et sessile, la virulence, l'adhésion, la mobilité, la détoxification ou bien encore la réponse SOS (Tableau 6, Figure 12).

Parmi les régulateurs décrits, un intérêt tout particulier a été porté à la protéine régulatrice PrfA qui est indispensable pour le passage du mode de vie saprophyte au mode de vie parasitaire intracellulaire et à la virulence de *L. monocytogenes* (Freitag *et al.*, 2009, de las Heras *et al.*, 2011).

Cette protéine fait partie de la famille « Crp/ -Fnr » des régulateurs transcriptionnels (de las Heras *et al.*, 2011). Elle active la transcription en se liant à une séquence palindromique de 14 nucléotides (tTAACanntGTtAa en lettre capital les positions invariables et 2 mésappariements sont tolérés) dénommée boîte PrfA. Ce site de fixation spécifique est retrouvé devant 22 gènes, ce qui suggère la régulation de l'expression de ces gènes par PrfA (Scorti *et al.*, 2007). Trois groupes de gènes différemment régulés par la protéine PrfA ont été identifiés. Un premier groupe comprend les gènes de l'îlot de pathogénécité LIPI-1 nécessaires à la vie intracellulaire et la virulence de *L. monocytogenes*, auxquels s'ajoutent deux autres gènes, *lmo2219* et *lmo0788*, activés par PrfA. Le second groupe concerne 8 gènes codant des transporteurs ABC réprimés en présence de PrfA (*lmo0278* et *lmo0178-lmo0184* organisés en opéron). Un dernier groupe est constitué de 53 gènes dont seulement deux (*lmo0596* et *lmo2067*) sont potentiellement précédés d'une boîte PrfA (Milohanic *et al.*, 2003). De plus, une analyse différentielle des données de transcriptomique de la souche parentale EGD-e de *L. monocytogenes* et d'un mutant $\Delta prfA$ montre que l'expression d'au moins 145 gènes serait indirectement liée à l'activité de PrfA (Scorti *et al.*, 2007, Freitag *et al.*, 2009). Ces études révèlent que (i) le rôle de PrfA ne concerne pas uniquement la régulation de la virulence (ii) PrfA pourrait exercer un rôle plus général dans la physiologie de *L. monocytogenes* comme par exemple la régulation de l'activité chitinase (Larsen *et al.*, 2010) et la formation de biofilm (Zhou *et al.*, 2011) (iii) PrfA peut agir à la fois comme

activateur et comme répresseur. Un niveau basal de transcription de *prfA* est assuré par deux promoteurs P1PrfA et P2PrfA qui sont respectivement régulés par les facteurs σA et σB . Leur rôle est d'assurer un niveau constant et flexible de transcrits de PrfA (Freitag *et al.*, 1993, Ollinger *et al.*, 2009).

Le passage à la température de 37°C est un signal environnemental de la transition entre la vie extracellulaire et intracellulaire. A des températures inférieures à 30°C, l'ARNm de *prfA* possède une structure secondaire de type tige-boucle qui masque le site de fixation du ribosome (RBS, « ribosome binding site »). Dans cette conformation, ce thermosenseur limite la traduction de l'ARNm en protéine. Le passage à 37°C déstabilise la structure tige-boucle, la traduction de l'ARNm est alors plus importante et la quantité de PrfA augmente (Johansson *et al.*, 2002). Ainsi le stimulus température est intégré dans l'activité de PrfA pour assurer une expression adaptée du régulon, avec une induction maximale lors de la vie intracellulaire de la bactérie et une répression lors de sa vie saprophyte dans l'agroenvironnement (comme par exemple dans le sol) (Piveteau *et al.*, 2011). Les sources de carbone disponibles lors de la vie saprophyte et au cours de la vie intracellulaire sont différentes. La nature des sources de carbone disponibles constitue un signal environnemental qui se traduit par des changements métaboliques. Ainsi, l'activité de la protéine PrfA est affectée par la présence de certains sucres (Behari & Youngman, 1998a, de las Heras *et al.*, 2011). La présence de cellobiose induit une répression de l'expression de gènes dépendant de PrfA (*hly* et *plcA*), au même titre que certains disaccharides caractéristiques de l'environnement extracellulaire (le maltose, obtenu après hydrolyse de l'amidon, et le tréhalose qui est naturellement retrouvé chez certaines plantes, champignons, insectes et nématodes) (Milenbachs *et al.*, 1997). Ces sucres pourraient donc agir comme des molécules signal de l'environnement extracellulaire comme par exemple l'environnement tellurique.

Les données disponibles sur les autres régulateurs transcriptionnels sont plus limitées. Néanmoins, l'utilisation de mutants de délétion ou pour lesquels le régulateur transcriptionnel est non fonctionnel a permis d'identifier le rôle de certains d'entre eux. Le répresseur CodY a un rôle central dans la régulation du métabolisme des acides aminés, l'assimilation d'azote et de sucres chez *L. monocytogenes* (Bennett *et al.*, 2007) ainsi que dans la régulation de facteurs de virulence (Stenz *et al.*, 2011, Lobel *et al.*, 2012). Le régulateur CcpA est un répresseur catabolique et est de ce fait un élément important pour la régulation du métabolisme du carbone chez *L. monocytogenes* (Behari & Youngman, 1998b). De la même façon, le régulateur transcriptionnel Lmo2128 intervient dans la régulation des transporteurs

et des enzymes de la voie d'utilisation du maltose et de la maltodextrine (Gopal *et al.*, 2010) et Lmo0958 intervient dans le métabolisme des osamines (Popowska *et al.*, 2012). L'homéostasie du fer et du zinc est nécessaire au fonctionnement de la quasi-totalité des organismes et à l'activité de leurs enzymes alors que des concentrations intracellulaires trop élevées peuvent devenir toxique. Chez *L. monocytogenes*, les niveaux intracellulaires de fer et de zinc sont régulés par Fur (ferric uptake regulator) et ZurR (zinc uptake regulator). En réponse à une limitation en fer, Fur réprime l'expression d'une dizaine de gènes codant des protéines impliquées dans la biosynthèse des acides aminés, le métabolisme énergétique et les processus cellulaires, et des transporteurs ABC. De plus, le répresseur PerR est nécessaire pour la régulation des gènes contrôlés par Fur (Ledala *et al.*, 2010). PerR joue également un rôle important dans la croissance et la résistance au stress oxydatif chez *L. monocytogenes* (Rea *et al.*, 2005). De la même façon, ZurR régule des fonctions impliquées dans la résistance aux concentrations élevées en zinc ainsi que dans la virulence de *L. monocytogenes* (Dowd *et al.*, 2012). Ceci n'est pas surprenant puisque le zinc est essentiel pour la motilité intracellulaire de *L. monocytogenes* (Corbett *et al.*, 2012). De plus, une étude *in silico* complémentée d'une approche de PCR quantitative a montré que ZurR régule l'expression de 3 transporteurs ABC, ce qui pourrait expliquer son rôle dans le maintien des niveaux intracellulaires de zinc (Dowd *et al.*, 2012). Deux régulateurs transcriptionnels ont été identifiés comme dépendant de la température. CtsR et HrcA sont des répresseurs de la transcription des protéines de choc thermique de classe III et de classe I. Ces protéines apportent à *L. monocytogenes* une résistance à la chaleur mais aussi aux concentrations élevées en sel (Nair *et al.*, 2000, Ringus *et al.*, 2012), à la nisine (Liu *et al.*, 2013) et aux désinfectants (acide peracétique et chlorure de benzalkonium) (van der Veen & Abee, 2010b). De plus, HrcA serait indirectement impliqué dans l'induction et la répression de 56 autres gènes codant des protéines impliquées dans la résistance au froid, à la chaleur, au stress oxydatif et acide (Hu *et al.*, 2007b).

La régulation de la motilité en fonction de la température est une caractéristique physiologique de *L. monocytogenes*. Les bactéries sont motiles aux températures inférieures à 37°C, mais deviennent immobiles à 37°C. Chez *L. monocytogenes*, la régulation de la transcription des gènes de mobilité est assurée par le répresseur transcriptionnel MogR (Gründling *et al.*, 2004) et l'anti-répresseur GmaR (Kamp & Higgins, 2009). Lorsque la température est de 22°C à 28°C, GmaR forme un complexe avec MogR. GmaR inhibe ainsi l'action répresseur de MogR et les gènes de mobilité sont transcrits. A l'inverse, en cas

d'élévation de température, le complexe MogR:GmaR est déstabilisé, la transcription des gènes de mobilité est alors réprimée par MogR (Kamp & Higgins, 2011). La répression de ces gènes est nécessaire pour induire la virulence (Kamp & Higgins, 2009). Le couplage entre la température et la stabilité du complexe MogR:GmaR s'explique par le fait que GmaR est une protéine thermosenseur dont la conformation est modifiée selon la température. Les régulateurs GltC et Lmo0753 interviennent quant à eux dans l'adhérence et la formation de biofilm de *L. monocytogenes*, lors d'un stress oxydatif (eau oxygénée, hydroperoxyde de cumène et acide peracétique) (Huang *et al.*, 2013) et nutritif (Salazar *et al.*, 2013). L'activateur transcriptionnel Lmo0501, similaire au MltR (mannitol transcription regulator) de *B. subtilis* (Joyet *et al.*, 2010), intervient dans la résistance aux conditions de stress acide. Il joue également un rôle lors d'un stress froid et osmotique (Michel *et al.*, 2011). De la même façon, l'activateur transcriptionnel ArgR contribue à la survie et la croissance de *L. monocytogenes* dans un environnement acide (Ryan *et al.*, 2009). En réponse au stress acide, ArgR active le système ADI (pour arginine deiminase) qui est connu pour faciliter la résistance d'espèces bactériennes aux faibles pH (Cui *et al.*, 2001, Wanaseen *et al.*, 2007). Le répresseur LadR intervient dans la détoxification de la cellule en régulant la transcription des systèmes de pompes à efflux (Huillet *et al.*, 2006). Il permet notamment d'exporter activement plusieurs antibiotiques (céfotaxime, ampicilline, tetracycline, erythromycine, clindamycine et josamycine), le bromure d'éthidium et certains métaux lourds (cadmium, zinc, cobalt, cuivre, chrome et arsenic) hors du cytoplasme de la cellule (Mata *et al.*, 2000). Finalement, en cas de lésions de l'ADN (dus à l'exposition des cellules à la mitomycine C, à la rifampicine ou à la streptomycine), une réponse SOS se met en place ; la protéine LexA réprime l'expression de 29 gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse et la réparation de l'ADN et la division cellulaire (van der Veen *et al.*, 2010).

Ainsi, par l'action de ces régulateurs, *L. monocytogenes* est en mesure d'adapter sa physiologie en fonction des conditions environnementales qu'elle rencontre. Leur action est complétée par les régulateurs de réponse des systèmes à deux composants.

1.2.3. Les systèmes à deux composants chez *L. monocytogenes*

Parmi les souches de *L. monocytogenes* dont le génome a été séquencé, le nombre de systèmes à deux composants varie de 14 à 16 (Vivant *et al.*, 2013a) (Annexe). Par exemple, le génome de *L. monocytogenes* EGD-e contient quinze histidines kinases et 16 régulateurs appartenant à des systèmes à deux composants (Glaser *et al.*, 2001). En tenant compte de la taille respective des génomes, la proportion du génome de *L. monocytogenes* allouée aux

systèmes à deux composants est similaire à celle de la majorité des bactéries ubiquistes (Glaser *et al.*, 2001). Par exemple *Bacillus subtilis* possède 37 systèmes à deux composants pour environ 4100 gènes et *Escherichia coli* 30 pour 4300 gènes. De plus, le nombre de systèmes à deux composants de *L. monocytogenes* est supérieur à celui de certains pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis* (11/3900) et *Neisseria meningitidis* (5/2200) (Glaser *et al.*, 2001).

Le rôle de certains de ces systèmes à deux composants dans la physiologie de *L. monocytogenes* a été décrit (Tableau 6, Figure 12). Des mutants présentant une délétion des gènes codant le régulateur de réponse des systèmes AgrCA, LisKR, VirRS et DegU ont un niveau de virulence atténué dans le modèle murin (Cotter *et al.*, 1999, Autret *et al.*, 2003, Mandin *et al.*, 2005, Williams *et al.*, 2005). Les systèmes Lmo1173/1172, LisKR, VirRS, ResED, PhoRP et KdpDE sont quant à eux impliqués dans la réponse aux stress thermique, alcoolique et acide (Cotter *et al.*, 1999, Brondsted *et al.*, 2003, Williams *et al.*, 2005, Chan *et al.*, 2008a). D'autres systèmes à deux composants comme les systèmes CesKR, LisKR et LiaSR jouent un rôle dans la résistance de *L. monocytogenes* aux antibiotiques tels que les céphalosporines, un grand nombre de β -lactames (ampicilline, pénicilline, cefoxitin...) et la nisine (Cotter *et al.*, 2002, Kallipolitis *et al.*, 2003, Collins *et al.*, 2012). La motilité (Knudsen *et al.*, 2004) ou la mobilité (Flanary *et al.*, 1999, Williams *et al.*, 2005) sont également régulées en partie par les systèmes à deux composants CheAY et DegU. De plus, le système à deux composants AgrCA est impliqué dans la communication cellulaire. Il permet la détection de molécules de signalisation synthétisées par les cellules émettrices et joue un rôle dans l'adhésion, la formation de biofilm et la virulence chez *L. monocytogenes* (Autret *et al.*, 2003, Rieu *et al.*, 2007). La description détaillée du système Agr est consultable section 4.4. Finalement, le régulateur de réponse VirR du système à deux composants VirSR régule l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans l'invasion des cellules eucaryotes et la survie *in vivo* de *L. monocytogenes* (Mandin *et al.*, 2005). L'importance de VirR pour le passage à la vie intracellulaire n'est cependant pas claire car VirR est conservé chez *L. innocua*, souche considérée non pathogène pour l'Homme. De plus VirR intervient dans la tolérance de *L. monocytogenes* à l'alcool en impactant directement ou indirectement la composition de l'enveloppe cellulaire (Williams *et al.*, 2005).

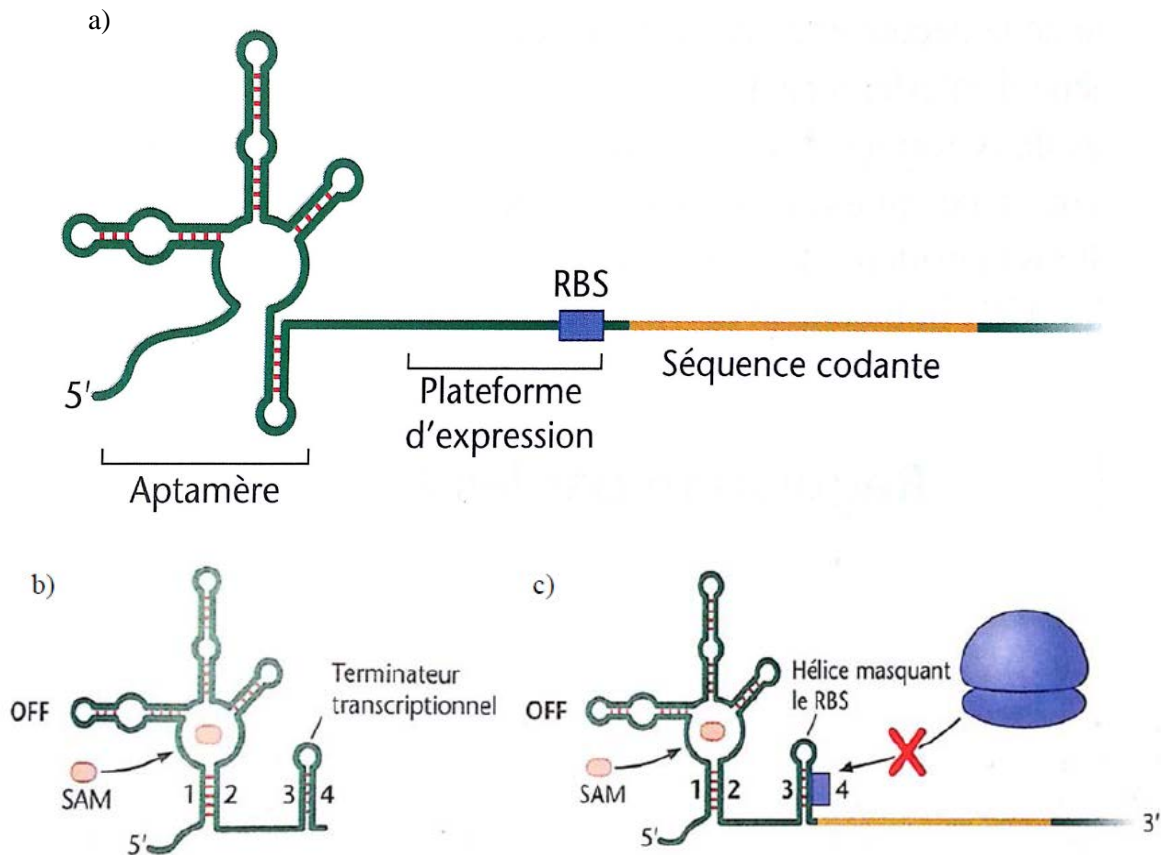


Figure 13. Organisation et modalités de fonctionnement des ribocommutateurs. Dans cet exemple, le ligand spécifique à l'aptamère est le S-adenosyl méthionine (SAM). a) Organisation d'un ribocommutateur en l'absence de SAM. b) La présence de SAM stabilise la structure et interrompt la transcription. c) L'initiation de la traduction n'est pas possible à cause de la présence d'une hélice qui masque le site de fixation du ribosome. Dans cet exemple, la modification de la structure de la plateforme d'expression entraîne la formation de deux tige-boucles (1-2 et 3-4). La tige-boucle 3-4 forme b) un terminateur de transcription ou c) une hélice masquant le site de fixation du ribosome (Watson *et al.*, 2009).

2. ARNs non codant, des acteurs de la régulation

Alors que la régulation de l'expression des gènes se fait préférentiellement lors de l'étape d'initiation de la transcription, d'autres gènes sont régulés au niveau post-transcriptionnel par des molécules d'ARNnc. Ces molécules interviennent dans la régulation de différents processus physiologiques nécessaires à l'adaptation des bactéries en modifiant la structure secondaire des ARNm par un mécanisme d'appariement entre les ARNnc et les ARNm (Mandin & Guillier, 2013).

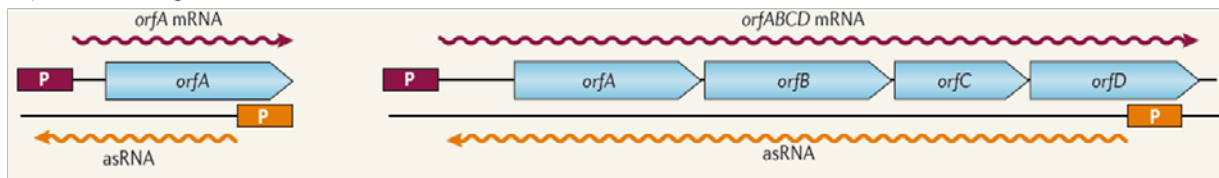
Ces régulations peuvent affecter la terminaison de la transcription mais affectent essentiellement la stabilité et la traduction des ARNm. Enfin, les ARNnc peuvent également modifier l'activité de certaines protéines. Les ARNnc sont répartis en plusieurs classes : (i) les ARN *cis*-régulateurs (ribocommutateurs), (ii) les ARN antisens *cis*-régulateurs (court ou long) et (iii) les petits ARN *trans*-régulateurs.

2.1. Différents types d'ARNs non codant

2.1.1. ARNs *cis*-régulateur : Ribocommutateurs

Les ribocommutateurs participent à la régulation de l'expression des gènes en bloquant ou en activant la traduction des ARNm ou en altérant la transcription. Ces structures d'ARN composées d'un aptamère et d'une plateforme d'expression sont localisées au niveau de la région 5' non traduite des ARNm (Figure 13a). L'interaction de l'aptamère avec un ligand qui lui est spécifique modifie la structure de la plateforme d'expression. La terminaison de la transcription peut s'en trouver altérée ou l'initiation de la traduction peut être inhibée (Storz *et al.*, 2005). Le ligand du ribocommutateur est en général un métabolite de la réaction catalysée par la protéine codée par l'ARNm, ce qui conduit à un mécanisme de rétroaction directe (Watson *et al.*, 2009). Par exemple chez *B. subtilis* de nombreux gènes impliqués dans la dégradation de la méthionine possèdent une région non traduite contenant un ribocommutateur de réponse au S-adénosylméthionine (SAM). Une fois transcrite, cette région de la molécule d'ARN adopte une configuration différente en fonction de la concentration en SAM. En présence d'une forte concentration en SAM, la liaison de SAM à l'aptamère provoque la formation d'un terminateur de transcription rho-indépendant (Figure 13b) (Tomsic *et al.*, 2008). La transcription est donc interrompue. Dans d'autres cas, comme par exemple chez *E. coli*, la liaison de l'effecteur entraîne la formation d'un appariement intramoléculaire incluant le RBS (Figure 13c) (Nou & Kadner, 2000). L'expression du gène *butB*, qui code un transporteur membranaire de corrinoïdes, est réduite en présence

a) Courts et longs ARNs antisens



b) Chevauchement des UTRs agissant comme des ARNs antisens

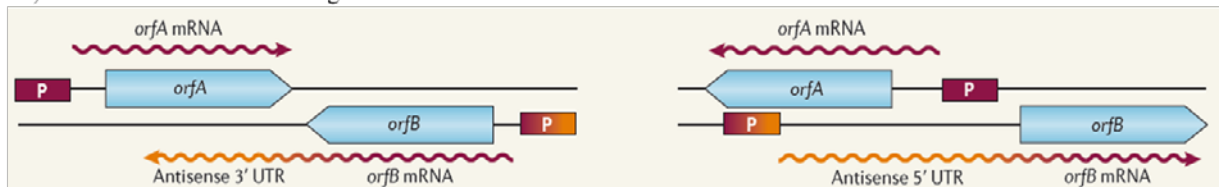


Figure 14. Différents type d'ARNs antisens *cis*-régulateur. a) Les ARNs antisens courts (à gauche) chevauchent un ORF unique alors que les ARN antisens longs (à droite) peuvent en chevaucher plusieurs. b) Les ARNs antisens peuvent aussi provenir d'un 3' UTR (à gauche) ou 5'UTR (à droite) de l'ARNm transcrit à partir d'un gène voisin (Sesto *et al.*, 2013).

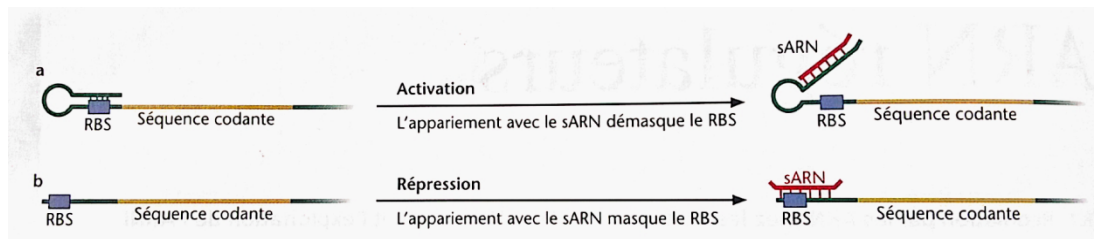


Figure 15. Activation et répression de la traduction des ARNm par les ARNs *trans*-régulateur. Le site de fixation du ribosome est a) démasqué ou b) masqué par un ARN *trans*-régulateur (en rouge). (Watson *et al.*, 2009).

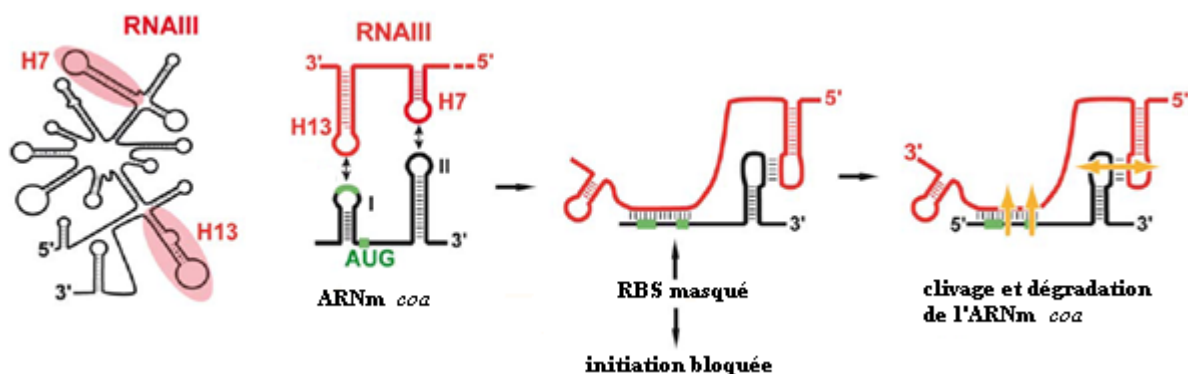


Figure 16. Représentation schématique de la répression de l'expression de *coa* par appariement de RNAIII avec l'ARNm de *coa*. D'après : (Chevalier *et al.*, 2010).

d'adénosylcobalamine (Ado-cbl, forme active de la vitamine B12). L'Ado-cbl limite la liaison de l'ARNm *btuB* avec le ribosome, ce qui inhibe l'initiation de la traduction.

2.1.2. ARNs antisens *cis*-régulateur

Les ARN antisens *cis*-régulateurs sont complémentaires aux brins d'ARNm et leur appariement avec les ARNm interfère avec la transcription ou la traduction (Storz *et al.*, 2005). Plusieurs types d'ARN antisens *cis*-régulateur existent : les courts et longs ARN antisens (Figure 14a) et les longs 5' ou 3' UTR (figure 14b) (Sesto *et al.*, 2013). Le fonctionnement du système toxine-antitoxine *hok/sok* d'*E. coli* est une des premières démonstrations du rôle régulateur d'ARN antisens (Faridani *et al.*, 2006). Ce système permet aux cellules contenant le plasmide R1 de survivre alors que celles qui ne le contiennent pas sont tuées. Le gène *hok* (host killing) code une protéine qui entraîne la mort de la cellule par la lyse de sa membrane. Dans les cellules contenant le plasmide R1, la traduction de l'ARNm de *hok* est réprimée par l'ARN antisens *sok* (suppressor killer). Quand le plasmide est perdu, du fait de la nature instable de l'ARN antisens *sok*, sa concentration diminue rapidement, le complexe ARNm *hok*/ARN antisens *sok* n'est plus formé, ce qui entraîne la traduction de la protéine Hok et la mort de la cellule.

2.1.3. ARNs *trans*-régulateurs

Les ARN *trans*-régulateurs sont dans la majorité des cas codés au niveau de régions intergéniques éloignées des gènes cibles. Ils agissent par appariement à de courtes séquences complémentaires et discontinues des ARNm. Cet appariement avec les ARNm peut avoir un effet positif ou négatif sur la traduction. L'appariement des ARNnc peut lever l'inhibition de la traduction en empêchant la formation d'une tige-boucle inhibitrice de la traduction (Figure 15a). A l'inverse, ces ARN *trans*-régulateurs peuvent empêcher la traduction des ARNm en formant un complexe qui masque le site de fixation du ribosome ou qui entraîne la dégradation des ARNm (Figure 15b) (Gottesman *et al.*, 2006). L'effecteur RNAIII du système Agr de *S. aureus* est un exemple d'ARN *trans*-régulateur qui a été décrit dans le détail. RNAIII agit à la fois sur la transcription et la traduction pour réguler la production de toxines, de protéines de surface et d'enzymes (Liu *et al.*, 2011). Par exemple, la synthèse de la staphylocoagulase codée par *coa* est réprimée par RNAIII. En effet, cet ARN *trans*-régulateur masque le RBS et une partie de la région codante (Figure 16). La formation du complexe d'initiation devient alors impossible. De plus, le point d'appariement RNAIII-ARNm de *coa* est la cible d'une ribonucléase qui dégrade l'ARNm de *coa* (Chevalier *et al.*, 2010).

2.2. ARNs non codant et processus physiologiques chez *L. monocytogenes*

A ce jour, dans le génome de *L. monocytogenes*, 271 ARNnc ont été identifiés : 42 ribocommutateurs, 95 antisens *cis*-régulateur et 134 *trans*-régulateur (Mandin *et al.*, 2007, Mraheil *et al.*, 2011, Mellin & Cossart, 2012, Wurtzel *et al.*, 2012, Behrens *et al.*, 2014). Ces ARNnc semblent jouer un rôle important dans la régulation de la virulence du pathogène.

En utilisant la méthode de « tilling arrays », Toledo-Arena *et al.* ont comparé le transcriptome de la souche parentale *L. monocytogenes* EGD-e et de mutants isogéniques *AprfA* et *AsigB* dans différentes conditions (lumière intestinale, sang, hypoxie et température de 30 et 37°C). Ce travail a permis d'une part de mettre en évidence des ARNnc et d'autre part d'observer une augmentation de leur quantité dans l'intestin et/ou le sang. Ces auteurs suggèrent que certains de ces ARNnc pourraient participer au contrôle du passage de la vie saprophyte à la vie parasitaire (Toledo-Arana *et al.*, 2009). Par exemple, *rli38* (un ARN régulé dans le sang et absent chez *L. innocua*) forme un complexe avec trois transcrits de gènes codant des protéines impliquées dans l'adaptation du pathogène au sang. Par ailleurs, la virulence du mutant de délétion *rli38* est atténuée dans le modèle murin. De plus, *rli28*, *rli32*, *rli34*, *rli38*, *rli49* et *rli50* s'apparient également avec les ARNm de gènes dont les produits sont potentiellement impliqués dans la virulence de *L. monocytogenes* comme par exemple les internalines (Toledo-Arana *et al.*, 2009). De la même façon, la capacité de multiplication intracellulaire de mutants ne produisant plus *rli31*, *rli33-1* et *rli50* est affectée dans les macrophages P338D1 de souris et leur virulence dans le modèle *Galleria mellonella* diminue significativement (Mraheil *et al.*, 2011). La méthode de « tilling array » a également permis d'identifier 7 ribocommutateurs se situant en amont de gènes codant des protéines intervenant dans le transport et le métabolisme de la méthionine et de la cystéine. Ces ribocommutateurs présentent un site de fixation de la S-adenosyl méthionine (SAM) et ont été nommés *sreA-G* (SAM riboswitch element) (Toledo-Arana *et al.*, 2009). Au moins 2 de ces ribocommutateurs, *sreA* (*rli11*) et *sreB* (*rli47*), peuvent être produits sous la forme de courts transcrits et peuvent se comporter comme des trans-régulateurs. Ils contrôlent l'expression du régulateur PrfA en se liant à la région 5' non traduite de son ARNm. La quantité de la protéine PrfA est augmentée dans les mutants *ΔsreA* et *ΔsreB*, alors que l'expression de PrfA est réprimée par la surexpression des transcrits *sreA* et *sreB*. De plus, l'interaction de SreA avec l'ARNm *prfA* n'est possible qu'à 37°C (Loh *et al.*, 2009). De façon intéressante, une diminution de la quantité d'ARNm d'*agrD* a été constatée dans le mutant *ΔsreA*, mais pas dans la souche *ΔsreB*, ce qui suggère un contrôle direct ou indirect de l'expression d'Agr par *sreA* (Loh *et*

al., 2009). Cependant le mécanisme de ce contrôle n'est pas encore connu. Les gènes de virulence *hly*, *actA* et *iap* sont aussi sujets à une régulation post-transcriptionnelle par l'action de ribocommutateurs mais le mécanisme de régulation n'est pas connu. Les ARNm *sod*, *gadA* et *fur* sont également précédés d'une région non traduite, ce qui suggère que l'expression de *Sod*, *GadA* et *Fur* fait l'objet d'une régulation post-transcriptionnelle (Mellin & Cossart, 2012).

Au delà de la virulence, des travaux montrent que les ARNnc participent à la régulation d'autres fonctions biologiques telles que le métabolisme et le transport des sucres régulés par RliI (Mandin *et al.*, 2007). Un ribocommutateur de la lysine, présent chez *L. monocytogenes* entre les gènes *lmo0798* et *lmo0799*, est capable à la fois de terminer la transcription du gène *lmo0798* et d'agir comme terminateur du gène *lmo0799* en présence de lysine (Toledo-Arana *et al.*, 2009). De la même façon, la transcription d'enzymes de la voie de biosynthèse de la vitamine B12 est réprimée de manière post-transcriptionnelle par un ribocommutateur dont le ligand est l'adenosylcobalamine (Mellin & Cossart, 2012). Un ribocommutateur a également été identifié devant le gène *glmS*. Ce gène code une enzyme responsable de la formation de glucosamine-6-phosphate (GlcN6P). Le ribocommutateur peut se lier au GlcN6P et l'utiliser comme cofacteur pour catalyser son clivage, ce qui entraîne la déstabilisation de l'ARNm *GlmS* et sa dégradation (Mellin & Cossart, 2012). Egalement, l'ARN *trans*-régulateur *lhrA* a été identifié comme régulateur de l'activité chitinase de *L. monocytogenes* (Nielsen *et al.*, 2011). Les chitinases comprenant ChiA et ChiB participent à la virulence de *L. monocytogenes* dans le modèle murin (Chaudhuri *et al.*, 2010) et permettraient l'acquisition de sources carbonées complémentaires.

Finalement, un long 5' UTR permet la régulation de gènes nécessaires à la synthèse des flagelles. Un site de transcription, activé par le facteur σ_B , et situé à 1697 pb en amont du codon d'initiation de *mogR* permet la transcription d'un long 5' UTR. Le fait que ce long 5' UTR chevauche 3 gènes nécessaires à la synthèse des flagelles laisse penser que l'expression de ces gènes pourrait être régulée par l'ARNnc. L'expression du long transcrit, activé par σ_B , induit une diminution de l'expression des gènes flagellaires alors qu'une mutation de *sigB* élimine l'expression du long transcrit MogR et entraîne une augmentation de l'expression des gènes flagellaires (Mellin & Cossart, 2012).

3. Réseau de régulation

Comme indiqué dans ce chapitre, les régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles permettent l'adaptation de la physiologie de *L. monocytogenes* aux conditions environnementales. Les facteurs Sigma, les régulateurs transcriptionnels et les ARNnc ne fonctionnent pas de manière indépendante mais, au contraire, participent à un réseau de régulation plus global. Le développement des approches transcriptomiques globales permet d'identifier des interconnexions entre régulons. Par exemple, la délétion de la protéine régulatrice AgrA de *L. monocytogenes* dérégule la transcription de 12 autres régulateurs transcriptionnels. Une action synergique entre AgrA et les régulateurs PrfA, σ B et σ H ainsi qu'une action antagoniste entre AgrA et CodY ont notamment été identifiées à la température de 37°C (Garmyn *et al.*, 2012). Une partie des gènes régulés par PrfA est également régulée par σ B, révélant un chevauchement des régulons PrfA et σ B (Hu *et al.*, 2007a, Hu *et al.*, 2007d, Ollinger *et al.*, 2009, Chaturongakul *et al.*, 2011). PrfA et σ B co-régulent la transcription de gènes importants pour le passage de *L. monocytogenes* du mode de vie saprophyte au mode de vie parasitaire intracellulaire (Ollinger *et al.*, 2009). L'expression des gènes ADI (arginine décarboxylase) est ainsi co-régulée par PrfA et σ B (Ryan *et al.*, 2009). De façon similaire, les régulons σ B, CtsR et HrcA sont interconnectés et forment ainsi un réseau de régulation de la réponse au stress et de la virulence σ B/CtsR/HrcA (Hu *et al.*, 2007b, Hu *et al.*, 2007c). Des interconnexions entre les régulons σ B et σ L et σ B et σ H ont aussi été identifiées. L'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, le transport des protéines, la virulence et la motilité est notamment sous le contrôle simultané de plusieurs facteurs Sigma (Chaturongakul *et al.*, 2011, Mujahid *et al.*, 2013a). De plus, la transcription de l'opéron SigH et de la protéine HrcA est dépendante de σ B, et la transcription de l'opéron SigC du facteur σ L (Chaturongakul *et al.*, 2011). Ces différentes analyses montrent que les facteurs σ B, σ L et σ H, les régulateurs transcriptionnels PrfA, CtsR et HrcA et le régulateur de réponse AgrA sont interconnectés dans un réseau de régulation transcriptionnelle. Ces interconnexions multiples permettent d'intégrer un nombre élevé d'informations (environnement abiotique, stress, niveau énergétique, invasion de l'Hôte, communication cellulaire et environnement biotique...) pour ajuster l'expression des gènes et donc adapter le mieux possible la physiologie de la cellule au contexte environnemental dans lequel elle se trouve.

D'autres études montrent l'implication des ARNnc dans ce réseau global de régulation transcriptionnelle. L'étude d'un mutant *AlhrA* montre que cette mutation affecte l'expression

de plus de 300 gènes dont une partie fait aussi l'objet d'une régulation par σ_B (Nielsen *et al.*, 2011). De plus, plusieurs ARNnc sont précédés d'une boîte σ_A , σ_B ou PrfA, ce qui suggère une possible régulation de la production des ARNnc par ces protéines (Oliver *et al.*, 2009, Mellin & Cossart, 2012). Ainsi, les ARNnc sont intégrés dans le réseau de régulation complexe qui apporte à la cellule bactérienne la possibilité d'ajuster précisément l'expression des gènes en réponse aux modifications des conditions environnementales. Par l'intermédiaire de ce réseau global de régulation, *L. monocytogenes* intègre de nombreux signaux environnementaux et convertit ces informations en une réponse concertée. De cette façon, la production des ARNm répond aux besoins physiologiques immédiats pour la cellule.

4. Les systèmes de communication : une innovation évolutive qui transforme notre vision du monde microbien

Depuis sa formalisation en tant que discipline scientifique, la microbiologie s'est appuyée principalement sur le paradigme de la culture pure qui présupposait que le phénotype de l'ensemble des cellules d'une population bactérienne était identique au phénotype moyen observé pour la population dans son ensemble. La découverte de la communication entre cellules au sein des populations bactériennes a modifié la façon d'envisager le fonctionnement des populations microbiennes. La démonstration de comportements coordonnés chez les bactéries, en réponse à leur environnement, ouvre alors le champ de la « sociomicrobiologie » qui préfigure un changement de paradigme.

4.1. Les différents systèmes de communication cellulaire

4.1.1. Définition de la communication cellulaire

La première description d'un système de communication bactérien auto-induit date de 1965 (Tomasz, 1965). Dans cet article, Tomasz identifie un produit extracellulaire (nommé « hormone-like ») qui participe à la régulation de la compétence de *Streptococcus pneumoniae* (Tomasz, 1965). Quelques années plus tard, Nealson *et al.* montrent que la bioluminescence de *Vibrio fischeri* peut être induite dans un milieu conditionné. Ces auteurs soulèvent l'hypothèse que l'accumulation de molécules entraînant une stimulation de la synthèse des ARNm serait à l'origine de cette activation (Nealson *et al.*, 1970).

Le principe de communication cellulaire dans le monde bactérien s'est formalisé à partir de ces travaux fondateurs. La communication cellulaire est basée sur la synthèse, la diffusion et la perception de molécules de faible poids moléculaire appelées de façon

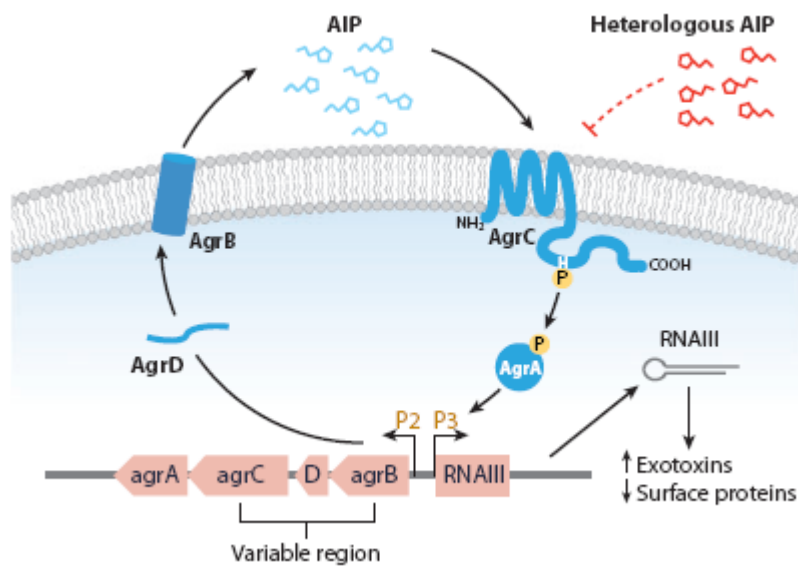


Figure 17. Représentation du système de communication Agr de *Staphylococcus aureus*. AgrD est maturé et exporté par la protéine transmembranaire AgrB. Les AIP excrétés se lient au récepteur transmembranaire AgrC, induisant sa phosphorylation. Le phosphate est transféré au régulateur de réponse AgrA qui active la transcription à partir des deux promoteurs P2 et P3. Le promoteur P2 permet l'autoinduction du système et le promoteur P3 la transcription de RNAIII, un ARN régulateur du système. D'après : (Novick & Geisinger, 2008).

générique molécules de signalisation ou molécules signal. La perception de ces molécules dans le milieu extracellulaire entraîne la régulation de la transcription de gènes cibles.

Pour être qualifié de molécule de signalisation, un métabolite doit répondre aux critères suivants : (i) les molécules de signalisation doivent être produites pendant une étape spécifique de la croissance bactérienne, ou sous certaines conditions physiologiques, ou encore en réponse à un changement environnemental (ii) elles doivent également s'accumuler dans le milieu extracellulaire et pouvoir être détectées par un récepteur spécifique (iii) l'accumulation de ces molécules doit déclencher une réponse cellulaire induisant des changements physiologiques (iv) la réponse cellulaire ne doit pas uniquement permettre une adaptation physiologique nécessaire au métabolisme ou à la détoxification de la molécule (Winzer *et al.*, 2002b).

Dans le monde bactérien, plusieurs systèmes de communication cellulaire ont été décrits. Ils diffèrent par la nature chimique de la molécule signal ainsi que par la machinerie utilisée pour traiter le signal. Les trois catégories de systèmes de communication les plus étudiés reposent sur l'échange de peptides auto-inducteurs (peptide qui stimule sa propre synthèse), d'acyl-homosérines lactones (acyl-HSL) et d'auto-inducteurs-2 (AI-2) comme signal. Cette section se focalisera sur ces trois grandes classes de molécules de signalisation.

4.1.2. Systèmes basés sur la détection de peptides auto-inducteurs

Le rôle signal de peptides linéaires ou cycliques a été décrit chez plusieurs Firmicutes (Lyon & Novick, 2004) mais pourrait également être observé chez des Protéobactéries (Michiels *et al.*, 2001). Un signal de nature peptidique nécessaire au déclenchement de la mort cellulaire a notamment été décrit chez *Escherichia coli* (Kolodkin-Gal *et al.*, 2007).

Détection du signal par un système à deux composants.

Les peptides signal sont le produit de la maturation d'une protéine précurseur et de modifications éventuelles au cours de leur sécrétion dans le milieu extracellulaire. Habituellement, un système à deux composants assure leur détection. Le système Agr (accessory gene regulator) de *Staphylococcus aureus* est un des exemples de système de communication basés sur l'échange de peptides qui a été décrit dans le détail (Figure 17) (Recsei *et al.*, 1986, Peng *et al.*, 1988). Les gènes du système Agr sont organisés en deux unités de transcription divergentes, RNAII et RNAPIII, placées sous le contrôle de deux promoteurs, respectivement P2 et P3. L'unité de transcription RNAII, codant le système de communication Agr, est un opéron formé des 4 gènes *agrBDCA*. Le gène *agrD* code le

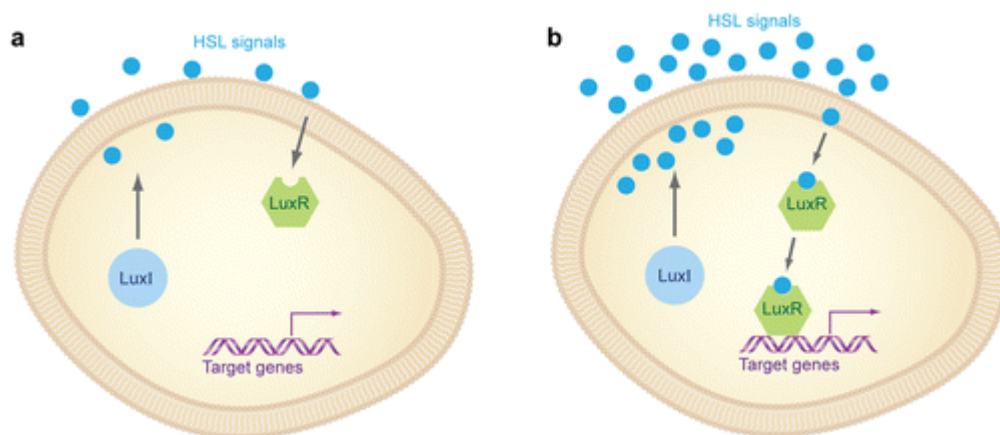


Figure 18. Représentation schématique de la circulation des acyl-homosérine lactones (acyl-HSLs) chez *Vibrio fischeri*. a) LuxI synthétise les acyl-HSLs qui traversent librement la membrane. En faible concentration dans l'environnement extracellulaire, elles ne déclenchent aucune réaction. b) Lorsque les acyl-HSLs atteignent une concentration seuil, elles diffusent à l'intérieur de la cellule et forment un complexe avec le régulateur transcriptionnel LuxR. Le complexe ainsi formé induit une régulation des gènes cibles (Jayaraman & Wood, 2008).

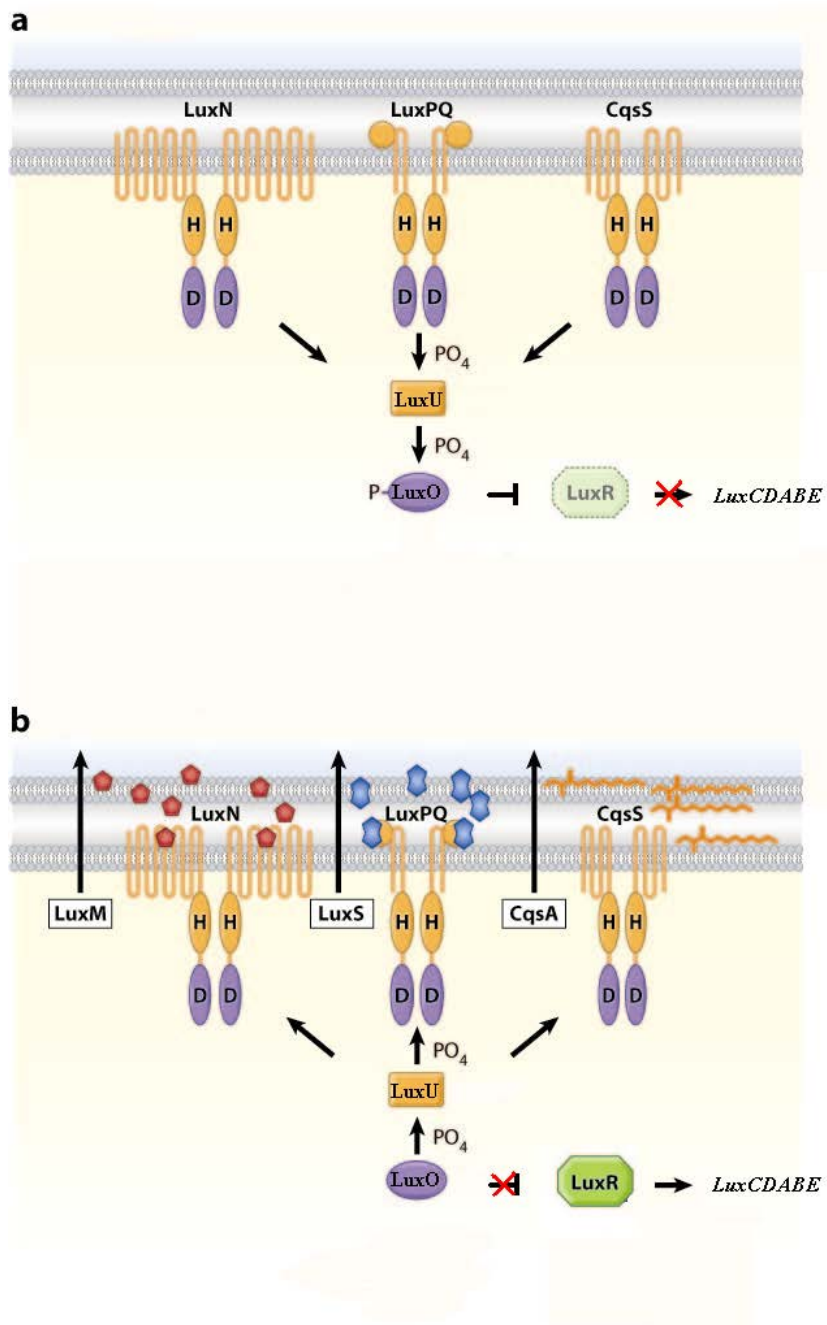
propeptide précurseur du peptide auto-inducteur (AIP) qui est maturé et exporté par la protéine transmembranaire codée par *agrB* en association avec la peptidase SpsB. AgrC et AgrA constituent un système classique à deux composants pour lequel AgrC est le récepteur transmembranaire histidine kinase et AgrA le régulateur transcriptionnel de réponse (Lina *et al.*, 1998). A forte densité cellulaire, la détection des AIPs extracellulaires par le récepteur AgrC entraîne la phosphorylation de ce dernier et le transfert du groupement phosphate sur le régulateur transcriptionnel AgrA. Sa phosphorylation permet l'activation des promoteurs P2 et P3 par fixation de AgrA phosphorylé sur des séquences répétées situées dans la région intergénique qui sépare les deux promoteurs (Reynolds & Wigneshweraraj, 2011). L'opéron *agrBDCA* assure ainsi son auto-induction. L'unité de transcription RNAIII produit un ARN régulateur qui est l'effecteur de l'opéron Agr. Des variations alléliques dans la région *agrBDC* sont à l'origine du classement des souches de *S. aureus* en au moins 4 groupes en fonction de la séquence de l'AIP synthétisé (Ji *et al.*, 1997).

Sur la base d'analyses *in silico* de 384 génomes, des systèmes orthologues du système Agr ont été identifiés chez plusieurs Firmicutes appartenant aux taxons *Staphylococcaceae*, *Lactobacillales*, *Clostridia* et *Listeriaceae*. Parmi les systèmes mis en évidence, se retrouvent le système Fsr d'*Enterococcus faecalis*, le système Lam de *Lactobacillus plantarum* ainsi que les systèmes Agr de *Clostridium acetobutylicum*, *C. perfringens* et de *L. monocytogenes*. Des différences existent entre le système Agr de *S. aureus* et les systèmes orthologues comme par exemple l'absence de RNAIII dans les génomes de *L. monocytogenes*, *L. plantarum* et *E. faecalis* (Autret *et al.*, 2003, Wuster & Babu, 2008).

Le système Agr n'est cependant pas commun à tous les Firmicutes. Par exemple, il n'est pas détecté chez les bactéries appartenant aux *Bacillaceae* et aux *Mycoplasmatales* (Wuster & Babu, 2008).

Détection du signal après internalisation dans le cytoplasme

Des systèmes de communication dans lesquels le peptide signal est, dans un premier temps, internalisé dans le cytoplasme par des transporteurs ABC avant d'être détecté par un effecteur intracellulaire ont également été décrits. Le système PapR/PlcR de *Bacillus cereus* suit ce principe (Slamti & Lereclus, 2002). L'activité du régulateur pléiotrope PlcR est sous le contrôle du peptide signal PapR. Ce peptide est maturé et sécrété dans le milieu extracellulaire. Lorsque la concentration dépasse un niveau seuil, le peptide signal PapR est importé dans la cellule par le système de transport d'oligopeptides OppBCDF (Gominet *et al.*, 2001). Dans le cytoplasme, l'interaction de PapR avec le régulateur transcriptionnel PlcR




 Ng W-L, Bassler BL. 2009.
Annu. Rev. Genet. 43:197–222

Figure 19. Représentation schématique de la détection des acyl homosérine lactones (acyl-HSL) par les systèmes à deux composants chez *Vibrio harveyi*. a) A faible densité cellulaire, la phosphorylation de LuxO suite au transfert du groupe phosphorylé de LuxU apporté par les histidines kinases LuxN, LuxPQ et CqsS provoque la répression du régulateur LuxR et l'absence de transcription de l'opéron *luxCDABE*. b) Lorsque la concentration en acyl-HSL atteint un niveau seuil, celles-ci sont détectées par les récepteurs histidines kinases, provoquant la déphosphorylation de LuxU et par conséquent, la déphosphorylation de LuxO. Ceci entraîne une levée de la répression sur LuxR, la transcription de l'opéron *luxCDABE* et la production de lumière. D'après : (Ng & Bassler, 2009).

augmente l'affinité de ce dernier pour un motif appelé « boîte PlcR », localisé dans la région promotrice des gènes cibles. La comparaison des séquences de PlcR et de PapR à partir de 29 souches du groupe de *B. cereus* a permis d'identifier 4 classes d'appariement PlcR-PapR, aboutissant en 4 phénotypes distincts chez *B. cereus* (Slamti & Lereclus, 2005).

4.1.3. Systèmes basés sur la détection d'acyl-homosérine lactones

Le rôle de molécule de signalisation d'acyl-HSL a été décrit chez les Protéobactéries (Whitehead *et al.*, 2001). Bien que la structure de base de ces molécules soit conservée, la longueur et le degré de substitution ou de saturation de la chaîne acyl apporte sa spécificité à la molécule de signalisation. Chez une même espèce bactérienne, la nature des acyl-HSLs peut varier (Gowda *et al.*, 2013). La structure à la fois hydrophile (cycle lactone) et hydrophobe (chaîne acyl) des acyl-HSLs leur permet de naviguer aussi bien au travers des membranes que dans les environnements aqueux intracellulaire et extracellulaire. Ainsi, lorsque la concentration en acyl-HSLs atteint un seuil critique dans le milieu extracellulaire, les acyl-HSLs peuvent diffuser à l'intérieur de la cellule et interagir avec un régulateur transcriptionnel, ce qui entraîne l'activation et/ou l'inhibition de la transcription de gènes cibles. Les systèmes *luxIR* illustrent ce mécanisme de communication cellulaire (Figure 18). Les HSLs, synthétisées par LuxI, diffusent librement à travers la membrane. Lorsque les HSLs atteignent une concentration seuil, elles diffusent à l'intérieur du cytoplasme de la cellule et forment un complexe avec le régulateur transcriptionnel LuxR. Le complexe ainsi formé induit une régulation des gènes cibles (Jayaraman & Wood, 2008).

La détection des acyl-HSL ne se fait pas uniquement dans l'environnement intracellulaire. En effet, la détection des acyl-HSL extracellulaires peut se faire par interaction avec des systèmes à deux composants (Ng & Bassler, 2009, Ray & Visick, 2012). C'est le cas des phosphorelais Lux, schématisés dans la Figure 19. Chez *V. harveyi*, des protéines histidine kinase transmembranaires (LuxN, LuxPQ et CqsS) sont les récepteurs de molécules de signalisation. LuxN, LuxPQ et CqsS possèdent à la fois une activité kinase et une activité phosphatase. A faible densité cellulaire, l'activité kinase est prédominante, ce qui résulte en la phosphorylation des récepteurs. Les groupements phosphates des trois récepteurs membranaires sont transférés à la protéine LuxU qui phosphoryle à son tour le régulateur de réponse LuxO. La phosphorylation de LuxO se traduit par la répression du régulateur LuxR et l'absence de transcription de l'opéron *luxCDABE*. Lorsque la concentration d'acyl-HSL atteint un niveau seuil, celle-ci est détectée par les récepteurs histidine kinase, provoquant la déphosphorylation de LuxU et, par conséquent, la déphosphorylation de LuxO. Ceci entraîne

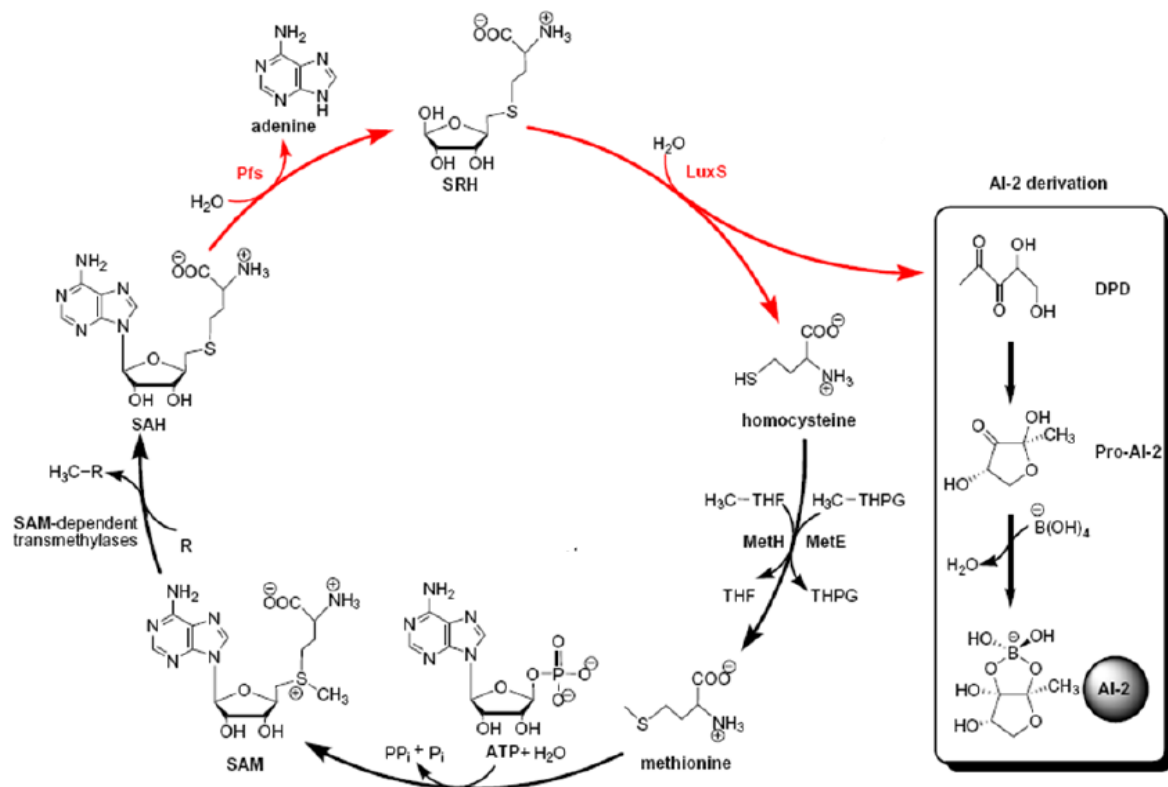


Figure 20. Voie de synthèse des AI-2. La méthionine est convertie en SAM, puis en SAH. Les enzymes Pfs et LuxS catalysent par la suite la conversion du SAH en DPD qui se réarrange spontanément en molécules de signalisation AI-2. Abréviations : SAM, *S*-adenosyl-méthionine; SAH, *S*-adenosyl-homocysteine; SRH, *S*-ribosyl-homocysteine; DPD, 4,5-dihydroxyl-2,3-pentanedione; Pro-AI-2, précurseur des AI-2; AI-2, auto-inducteur 2. D'après : (Sun et al., 2004).

une levée de la répression sur LuxR et la transcription de l'opéron *luxCDABE* (Ng & Bassler, 2009).

4.1.4. Systèmes basés sur la détection d'auto-inducteurs 2

Les AI-2 sont une famille de molécules qui dérivent de la dégradation du S-adenosyl homocystéine (SAH) et du dihydroxy-2,3 pentanedione (DPD). La voie de synthèse des AI-2 n'est pas complètement décrite. Les enzymes Pfs et LuxS catalysent la conversion du SAH, un sous-produit toxique issu de la déméthylation de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM), en DPD qui se réarrange spontanément en une série de molécules appelées AI-2 (Figure 20) (Pei & Zhu, 2004). Ces molécules peuvent être reconnues par un récepteur membranaire LuxP et induire sa phosphorylation. S'en suit une phosphorylation en cascade de LuxP vers le régulateur de réponse LuxO, entraînant ainsi la régulation de gènes cibles.

La présence d'orthologues de *luxS* et *pfs* dans le génome de nombreux Protéobactéries et Firmicutes (Schauder *et al.*, 2001, Sun *et al.*, 2004) a conduit certains auteurs à désigner les AI-2 comme molécules de signalisation universelles pour la communication entre espèces (Xavier & Bassler, 2003). Les molécules AI-2 produites peuvent effectivement fonctionner comme molécules de signalisation chez certaines espèces comme *Vibrio harveyi*, mais leur rôle de molécule de signalisation ne peut pas être étendu à l'ensemble des espèces bactériennes (Hardie & Heurlier, 2008).

En effet, les critères de Winzer permettant de qualifier un métabolite de molécule de signalisation ne sont pas respectés chez toutes les espèces bactériennes. Le gène codant le récepteur membranaire LuxP nécessaire à la détection des AI-2 est en effet absent dans la majorité des espèces bactériennes (Rezzonico & Duffy, 2008). De plus, plusieurs études indiquent que la protéine LuxS est impliquée en premier lieu dans la détoxification de la cellule (recyclage des SAH) (Winzer *et al.*, 2002a, Sperandio *et al.*, 2003, Vendeville *et al.*, 2005). Ceci suggère que les AI-2 produites chez ces espèces bactériennes ne sont pas des molécules de signalisation. L'implication des AI-2 dans un système de communication doit donc être envisagée avec précaution.

4.2. La communication cellulaire, un concept à préciser

Le concept de communication cellulaire reste à l'heure actuelle partiellement défini. « Comment les bactéries utilisent-elles ces systèmes pour sonder leur environnement? », « quel type d'information les bactéries peuvent-elles en tirer? » sont des questions ouvertes. Pour cela différents concepts ont été développés.

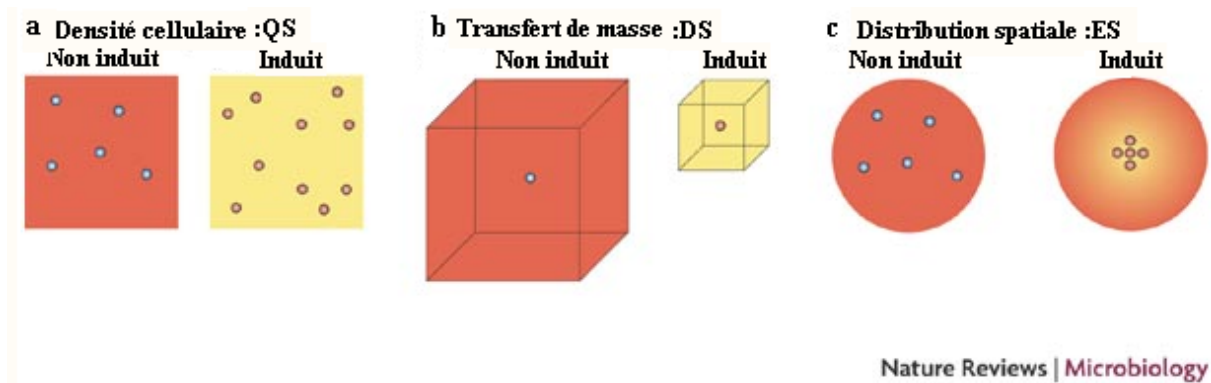


Figure 21. Quorum sensing, diffusion sensing et efficiency sensing. Les informations que les cellules obtiennent à partir de la communication cellulaire est le résultat de la détection d'une combinaison de la densité cellulaire, des conditions environnementales (transfert de masse) et de la distribution spatiale des cellules. a) Quorum sensing. La concentration des molécules de signalisation dans un environnement homogène sans limitation de transfert de masse et sans regroupement spatial des cellules, mesure la densité cellulaire. b) Diffusion sensing. La concentration des molécules de signalisation produites par une cellule individuelle mesure le degré de diffusion des molécules par rapport aux obstacles abiotiques et biotiques présents dans l'environnement et par rapport à la composition de la matrice environnementale. Un espace suffisamment confiné induit une régulation de l'expression des gènes. c) Efficiency sensing. La concentration des molécules de signalisation en l'absence de contrainte de transfert de masse mesure la distribution spatiale des cellules. Le regroupement spatial des cellules entraîne une régulation de l'expression des gènes. *Les environnements rouge et jaune indiquent une faible et forte concentration des molécules signales, respectivement. Les bactéries en bleu n'ont pas déclenché une régulation de l'expression des gènes, alors que les bactéries en rouge l'ont déclenché.* D'après : (Hense et al., 2007).

4.2.1. Perception de la densité de population : Quorum sensing

Le terme générique de « quorum sensing, QS » a été introduit par Fuqua et ses collaborateurs en 1994 (Fuqua *et al.*, 1994). Dans cette revue, les auteurs définissent le système de communication auto-induit comme un « système de détection de l'environnement qui permet aux bactéries de mesurer leur densité cellulaire. La bactérie produit un composé nommé auto-inducteur qui diffuse et s'accumule dans l'environnement proche durant la croissance. A faible densité cellulaire, sa concentration est faible, tandis qu'à forte densité cellulaire cette substance s'accumule et atteint une concentration critique nécessaire à l'activation des gènes de luminescence ».

"Autoinduction defines an environmental sensing system that allows bacteria to monitor their own population density. The bacteria produce a diffusible compound termed autoinducer which accumulates in the surrounding environment during growth. At low cell densities this substance is in low concentration, while at high cell densities this substance accumulates to the critical concentration required for activation of luminescence genes."

Le QS est un cas particulier de communication cellulaire qui correspond à la croissance de bactéries dans un système fermé et homogène tel que les cultures planctoniques en « batch » où l'accumulation des molécules de signalisation peut avoir lieu. Cependant, *in situ*, les communautés bactériennes se trouvent fréquemment dans des systèmes ouverts et hétérogènes. Dans ce contexte, la concentration seuil en molécules de signalisation peut ne pas être atteinte et des facteurs autres que la densité cellulaire pourraient influencer la stabilité, la diffusion, la distribution et la détection du signal (facteurs physiques, chimiques et/ou biologiques). Ainsi, dans un système ouvert, les molécules de signalisation produites par les bactéries pourraient être entraînées par les flux de liquide (Horswill *et al.*, 2007). L'accumulation des molécules serait alors dépendante à la fois (i) du taux de synthèse des molécules mais aussi (ii) de la demie-vie des molécules dépendant de leur stabilité chimique et biologique (iii) des propriétés de diffusion des molécules et (iv) des conditions hydrodynamiques et de transfert de masse.

Aussi, récemment, de nouvelles théories telles que « diffusion sensing, DS » (Redfield, 2002) ou encore « efficiency sensing, ES » (Hense *et al.*, 2007) ont été proposées pour tenter d'expliquer le rôle des systèmes de communication (Figure 21, tableau 7).

Tableau 7. Quorum sensing, diffusion sensing et efficiency sensing. D'après : (Hense *et al.*, 2007).

Concept	QS	DS	ES
Mécanisme	Les cellules synthétisent, diffusent et perçoivent des molécules de signalisations, aboutissant en la régulation de l'expression d'une batterie de gènes		
Qu'est ce qui est détecté ?	Densité cellulaire	Propriétés de transfert de masse (conditions hydrodynamiques de l'environnement et capacité de diffusion des molécules sécrétées). Indépendant de la densité cellulaire et de la distribution des cellules dans l'environnement	Une combinaison de la densité cellulaire, des propriétés de transfert de masse et de la distribution des cellules
Dans quel but ?	Détecter les situations dans lesquelles la densité cellulaire est suffisante pour déclencher une réponse coordonnée	Détecter les situations dans lesquelles le transfert de masse est suffisamment limité pour qu'une cellule individuelle produise des molécules extracellulaires nécessaires à sa survie ou sa croissance	Déterminer si le contexte est propice à la production de métabolites.
Bénéfice	Pour le groupe	Pour l'individu	Pour le groupe et l'individu

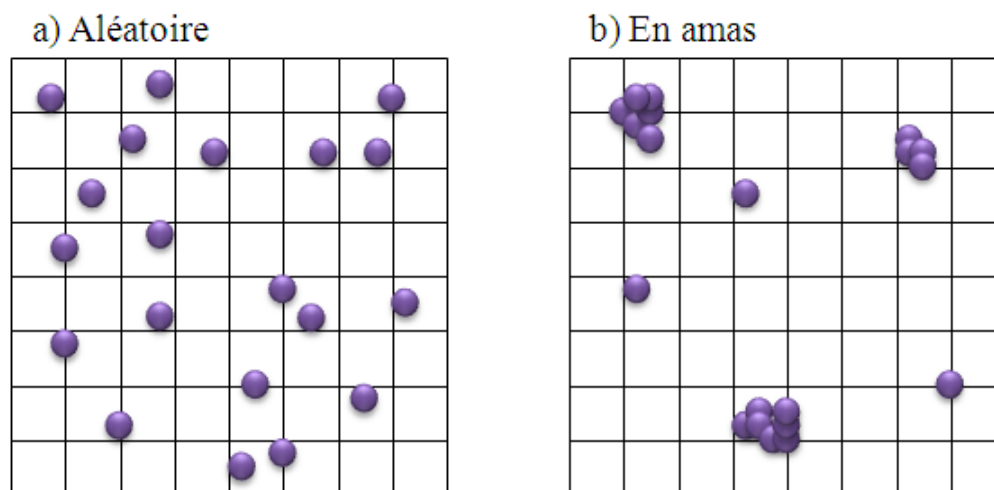


Figure 22. Distribution spatiale et densité cellulaire. Les deux quadrillages sont de même taille et contiennent le même nombre de cellules, la densité cellulaire est donc la même dans les deux cas de figure. Malgré tout, à même densité cellulaire, la distribution des cellules peut varier. Les cellules peuvent être distribuées a) de façon aléatoire ou b) en amas. L'accumulation des molécules de signalisation est favorisée au niveau de l'environnement des amas cellulaires. D'après : (Hense *et al.*, 2007).

4.2.2. Des sondes pour la perception des conditions hydrodynamiques : Diffusion sensing

Alors que le terme de QS fait référence à la perception de la densité cellulaire, le concept de DS développé par Redfield indique que les bactéries pourraient se servir des molécules de signalisation pour détecter les conditions hydrodynamiques de leur environnement proche en déterminant le taux de diffusion de ces molécules (Redfield, 2002). Les conditions hydrodynamiques peuvent changer considérablement selon l'environnement dans lequel se trouvent les bactéries. Les cellules qui produisent et détectent les molécules de signalisation pourraient ainsi évaluer ces changements et adapter leur physiologie en conséquence. Par exemple, pour augmenter la disponibilité en nutriments, certaines bactéries produisent des enzymes extracellulaires pour hydrolyser les macromolécules en de plus petites molécules assimilables. La sécrétion de ces enzymes n'est effective et avantageuse que si leur diffusion est limitée et seulement si les molécules hydrolysées restent suffisamment proches de la cellule pour être utilisées.

Ainsi, grâce à la perception des conditions hydrodynamiques, les bactéries pourraient limiter la perte de ces molécules extracellulaires si les conditions hydrodynamiques sont défavorables. Cette notion implique que le DS est un phénomène individuel qui participe à l'amélioration de la compétitivité de la cellule.

4.2.3. Une théorie rassemblant quorum sensing et diffusion sensing : Efficiency sensing

La notion d'ES tente de concilier QS et DS. Les systèmes de communication permettraient aux bactéries de détecter à la fois la densité cellulaire, les propriétés de transfert de masse et la distribution spatiale des cellules. Ainsi, la communication cellulaire apporterait une meilleure compétitivité à la fois pour la cellule individuelle et la population dans son ensemble. Le terme ES fait intervenir en plus la notion d'efficacité. Les cellules pourraient utiliser les molécules signal diffusibles pour déterminer si l'environnement est propice à la production d'exo-produits couteux pour la cellule (Hense *et al.*, 2007). La distribution spatiale intervient également dans le concept d'ES. A même densité cellulaire, les bactéries peuvent être réparties de façon homogène ou distribuées en amas (Figure 22). La concentration seuil permettant le déclenchement d'un comportement coordonné est atteinte plus rapidement dans les amas. Ainsi, la distribution spatiale des cellules pourrait influencer la concentration des molécules de signalisation.

En unifiant les deux concepts de QS et DS, l'ES permet donc de prendre en compte l'ensemble des paramètres qui peuvent affecter la concentration des molécules signal.

4.2.4. Comportements coopératif bactériens régulés par les systèmes de communication

Les comportements bactériens coordonnés, déclenchés par la communication cellulaire, peuvent être apparentés à des phénomènes de coopération et donc à des comportements sociaux (Keller & Surette, 2006, Diggle *et al.*, 2007a). Pour formaliser l'idée que des populations bactériennes peuvent générer une activité sociale, la notion de « sociomicrobiologie » a été introduite en 2005 par Parsek & Greenberg (Parsek & Greenberg, 2005) ce qui correspond à une nouvelle vision du monde microbien. Comme abordé dans le paragraphe précédent, les systèmes de communication cellulaire régulent la production et la sécrétion d'exo-produits (facteurs de virulence, antibiotiques ou surfactants) qui constituent la valeur de coopération des bactéries. Ces exo-produits assurent plusieurs fonctions qui semblent apporter un avantage à la population bactérienne.

La virulence est l'une de ces fonctions (Morfeldt *et al.*, 1995, Agaisse *et al.*, 1999, Autret *et al.*, 2003, Gohar *et al.*, 2008). Dans le cas d'une infection à *S. aureus*, la sécrétion des facteurs de virulence est induite par le système de communication Agr lorsque la concentration en cellules au site d'infection atteint une concentration suffisante (Novick & Geisinger, 2008). Chez *E. faecalis* le système Fsr contrôle l'expression d'une gélatinase et d'une serine protéase, impliquées dans la virulence de la souche (Qin *et al.*, 2001, Nakayama *et al.*, 2006). Des mutants du système Fsr ont un phénotype de virulence atténué dans le modèle de péritonite chez la souris et d'endophthalmitis chez le lapin (Qin *et al.*, 2000, Mylonakis *et al.*, 2002). Chez *C. perfringens*, le système Agr joue un rôle dans les infections clostridiales en régulant la production des toxines (Vidal *et al.*, 2011, Chen & McClane, 2012). La production de facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* est également régulée par la production et la détection de molécules de signalisation (Passador *et al.*, 1993, Pearson *et al.*, 1997).

D'autres fonctions sont aussi régulées par les systèmes de communication, notamment la mobilité, l'adhésion, l'agrégation, la formation et la dispersion de biofilms (Abee *et al.*, 2011). Le système Agr contrôle par exemple la dispersion des biofilms de *S. aureus* (Boles & Horswill, 2008) et le système Lam régule l'adhérence des cellules de *L. plantarum* sur les surfaces abiotiques (verre) ainsi que la morphologie et la viabilité des cellules (Sturme *et al.*, 2005, Fujii *et al.*, 2008). L'adhésion et la formation de biofilms chez *Vibrio fischeri* et *Serratia liquefaciens* (Labbate *et al.*, 2004, Ray & Visick, 2012), l'agrégation chez *Rhodobacter sphaeroides* (Puskas *et al.*, 1997) et la mobilité de *Pectobacterium atrosepticum*

(Bowden *et al.*, 2013) sont d'autres exemples de comportements bactériens coordonnés par des systèmes de communication.

De plus, les mécanismes de défense et de survie comme la sporulation, la formation de granulose et la production d'antibiotique sont des mécanismes pouvant être soumis à la régulation des systèmes de communication. Chez le genre *Clostridium*, le système Agr de *C. acetobutylicum* semble réguler la formation de granulose et le processus de sporulation (Steiner *et al.*, 2012) et plusieurs systèmes de communication (PhzIR et AurlR) interviennent dans la production d'antibiotique chez *Pseudomonas chlororaphis* (Morohoshi *et al.*, 2013). De façon similaire, la compétence et la production de molécules antibiotiques lipopeptidiques (surfactine) sont sous le contrôle du système de communication ComQXPA de la bactérie (Comella & Grossman, 2005).

Finalement, les systèmes de communication peuvent participer à la vie symbiotique des bactéries. Un cas de symbiose bien connu est celui de la bactérie marine *V. fischeri* avec des organismes eucaryotes (le calamar *Euprymna scolopes* et le poisson *Monocentris japonicus*) (Kaplan & Greenberg, 1985, Ruby & McFallNgai, 1992, Visick & McFall-Ngai, 2000). Les bactéries occupent un organe luminescent de l'animal. L'accumulation de molécules de signalisation produites par *V. fischeri* induit une bioluminescence qui est utile à l'hôte pour attirer des proies ou repousser les attaques de prédateurs. En retour, *V. fischeri* a la possibilité d'utiliser les réserves nutritives de son hôte.

4.2.5. Communication cellulaire, comportements sociaux et évolution

La communication cellulaire soulève des interrogations d'un point de vue évolutif. La coopération sous-entend que les bactéries font preuve d'altruisme. Dans ce cas là, peut-on définir la communication cellulaire comme un trait social des populations bactériennes ? Dans une population d'organismes sociaux, les individus qui communiquent et coopèrent peuvent être exploités par des individus dits « égoïstes » ou « tricheurs » (Hamilton, 1964, Lehmann & Keller, 2006). En prospérant au détriment de la population, les tricheurs réduisent la valeur de la coopération. Chez les bactéries, les tricheurs peuvent être par exemple des mutants qui ne produisent plus de molécules de signalisation (mutant muet) ou bien encore des mutants qui ne répondent plus à la présence de molécules de signalisation (mutant sourd). En s'affranchissant des coûts liés à la production des molécules de signalisation, leur détection et la production d'exo-produits (Diggle *et al.*, 2007b), les tricheurs apparaissent avantagés. De tels tricheurs ont été isolés de populations de *P. aeruginosa* (Denervaud *et al.*, 2004, Schaber

et al., 2004). Afin d'étudier *in vitro* ce phénomène, Diggle *et al.* ont construit des mutants de délétion *lasI* et *lasR* du système de communication LasRI de *P. aeruginosa* (Diggle *et al.*, 2007b). Aucun des deux mutants ne produit de molécules de signalisation. En revanche, le mutant *lasI* participe au comportement coopératif (production de protéase) alors que le mutant *lasR* n'y participe pas. Les croissances des cultures pures de la souche parentale et des mutants ont été mesurées et comparées dans un milieu pour lequel la capacité à produire des protéases est nécessaire pour utiliser les ressources disponibles (milieu QSM). L'étude montre que les deux mutants présentent une croissance plus faible que la souche parentale dans le milieu QSM et que l'ajout de molécules de signalisation permet d'améliorer la croissance du mutant *lasI* en stimulant la production de protéase mais pas du mutant *lasR*. En revanche, en milieu complexe (milieu LB), les mutants atteignent une densité optique plus importante que la souche parentale. Ces premiers résultats montrent que (i) dans un environnement où le comportement coopératif est nécessaire pour la survie d'une communauté, les deux mutants sont défavorisés, (ii) le mutant *lasI* serait potentiellement un tricheur puisqu'il est capable de détourner et d'utiliser le signal présent dans le milieu, et que (iii) la production du signal et de protéase est métaboliquement coûteuse et, a priori, défavorable pour la souche parentale dans un milieu pour lequel le comportement coopératif n'est plus essentiel pour le développement de la communauté. Dans cette étude, l'analyse des résultats obtenus à l'aide de co-cultures de la souche parentale et des mutants (faible proportion de 1 à 3%) montre que le bénéfice de profiter du comportement coopératif de la communauté sans y participer apporte une meilleure compétitivité aux souches mutantes. En effet, après 48h de culture dans le milieu QSM, la proportion des mutants *lasR* et *lasI* augmente respectivement de 1 à 45% et de 3 à 66% au détriment de la souche parentale. Le mutant *lasI* est d'autant plus favorisé qu'il est capable de détourner et d'utiliser les signaux produits par la souche parentale pour produire les protéases nécessaires à la croissance dans le milieu QSM. Ainsi, le mutant *lasI* se développe sans subir le coût de production des signaux (Diggle *et al.*, 2007b).

Etant donné que la communication cellulaire induit un comportement altruiste coûteux pour la cellule et peut entraîner l'apparition de tricheurs au sein des populations, comment expliquer qu'un tel système ait pu être sélectionné et conservé lors du processus évolutif. Cette interrogation est l'un des grands problèmes de la théorie de l'évolution de Charles Darwin. Selon Charles Darwin (Darwin, 1859), un comportement est privilégié par la sélection naturelle quand celui-ci augmente la capacité d'un individu à survivre et à assurer sa

descendance. Le comportement altruiste, en revanche, favorise la survie de la population dans son ensemble.

L'explication la plus plausible quant au maintien d'un comportement altruiste dans les populations bactériennes est la théorie évolutive de sélection de parentèle développée par le biologiste de l'évolution Hamilton dans les années 60 (Hamilton, 1964). La loi de Hamilton intègre le degré d'apparentement entre individus. « *Les comportements altruistes seront favorisés par la sélection si les coûts (risques) pour effectuer le comportement sont moindre que les bénéfices (avantages) escomptés.* » Les individus privilégient ainsi les comportements de coopération avec leurs parents génétiques les plus proches car ils favorisent la propagation (indirecte) de leurs gènes aux générations futures (Hamilton, 1964). Des études expérimentales ont confirmé cette théorie. En maintenant des populations de *P. aeruginosa* avec un fort ou faible lien de parenté entre cellules, les auteurs ont montré que les systèmes de communication apportent un avantage aux populations lorsque le lien de parenté entre cellules est fort et un désavantage quand ce lien est faible (Griffin *et al.*, 2004, Diggle *et al.*, 2007b, Rumbaugh *et al.*, 2012).

Par ailleurs, dans les populations bactériennes, un contrôle intrinsèque sous forme d'une boucle de rétroaction dans les systèmes de communication cellulaire pourrait apporter un avantage à la cellule individuelle et limiter l'émergence de tricheurs en diminuant leur compétitivité. Ainsi, un mutant de *Bacillus subtilis* déficient dans la production de signal répond de façon excessive aux molécules de signalisation et surproduit les exo-produits. L'absence de rétro-contrôle entraînerait un coût énergétique excessif et donc une compétitivité moindre (Oslizlo *et al.*, 2014). Chez les populations animales et végétales, les individus qui ne coopèrent pas sont sanctionnés. Ce phénomène de punition pourrait expliquer, selon West, la stabilité des populations aux comportements sociaux (West *et al.*, 2007).

4.2.6. La communication cellulaire induit une hétérogénéité au sein des populations bactériennes Hétérogénéité phénotypique

Dans une même population isogénique, des variations significatives du contenu cellulaire (protéines, ARNs ou métabolites) des cellules individuelles peuvent être observées et se traduire par des différences phénotypiques. Cette variabilité est liée à la nature stochastique de l'expression des gènes (Elowitz *et al.*, 2002, Kaern *et al.*, 2005). Si ce phénomène de bruit stochastique concerne les gènes des systèmes de communication, cela

conduirait à un comportement individuel différent quand bien même chaque cellule recevrait la même quantité de molécules de signalisation.

Chez plusieurs modèles bactériens, l'échange de signaux conduit à une modification phénotypique partielle de la population. Par exemple, chez *V. harveyi*, à forte densité cellulaire, le système de communication Lux, qui intervient dans la bioluminescence des cellules, modifie le phénotype de 69% des cellules de la population (Anetzberger *et al.*, 2009). De plus, une variation de bioluminescence a été détectée au sein de chaque cellule, indiquant que le système ne fonctionne pas selon un mode bistable on/off mais qu'un gradient d'expression est présent dans la population. Cette hétérogénéité apporterait un avantage à la population de *V. harveyi*. La perte de l'hétérogénéité conduit en effet à une diminution de la quantité de biofilm produit (Anetzberger *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été obtenus pour la bioluminescence de *V. fischeri* (Perez & Hagen, 2010). Un système de communication est également responsable de l'hétérogénéité morphologique des cellules de la Protéobactérie marine *Dinoroseobacter shibae* (Patzelt *et al.*, 2013).

Les conditions environnementales influencent l'accumulation et la diffusion des molécules de signalisation. Hense *et al.* ont proposé un modèle mathématique pour analyser le fonctionnement des systèmes de communication dans les biofilms (Hense *et al.*, 2012). Ce modèle fait le lien entre facteurs environnementaux et systèmes de communication auto-induits. Il montre que des gradients de molécules de signalisation peuvent apparaître dans les populations spatialement structurées et induire une hétérogénéité phénotypique.

Vers un fonctionnement multicellulaire des populations bactériennes

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'intérêt d'une hétérogénéité phénotypique dans les populations bactériennes. L'hétérogénéité pourrait permettre un partage des tâches au sein des populations bactériennes (Hense *et al.*, 2012) d'une manière similaire au fonctionnement des organismes multicellulaires. James Shapiro est l'un des premiers à proposer le caractère multicellulaire des populations bactériennes (Shapiro, 1988). Il propose que le caractère multicellulaire est un caractère générique des bactéries. D'après lui, les bactéries bénéficient de cette coopération multicellulaire car en plus de la division du travail entre cellules, celle-ci permettrait aux bactéries : (i) d'accéder à des ressources qui ne pourraient pas être utilisées de manière efficace par les cellules uniques, (ii) de se défendre contre les antagonismes et (iii) d'optimiser la survie de la population grâce à la différenciation en plusieurs « types » de cellules (Shapiro, 1988). La génération de descendance avec une

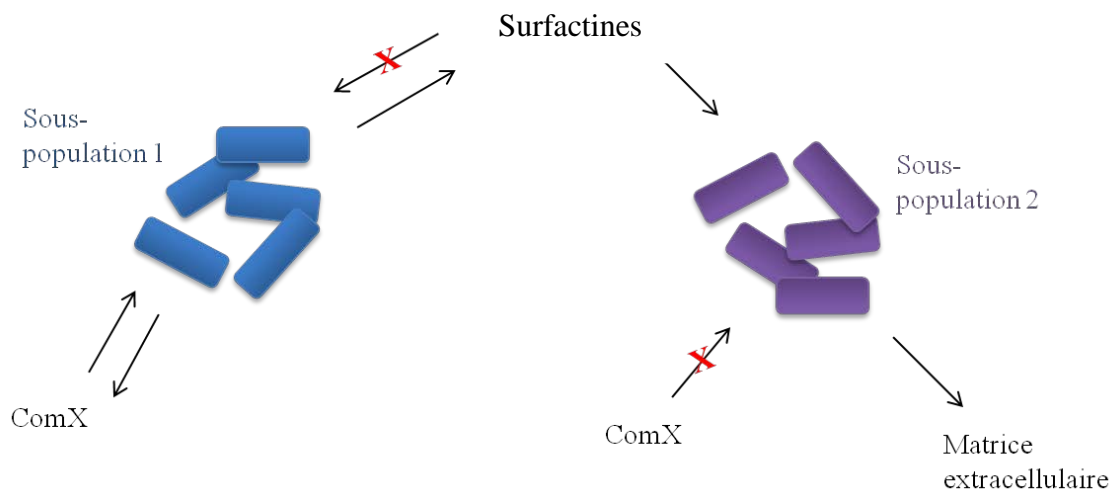


Figure 23. Hétérogénéité des populations de *Bacillus subtilis*. La signalisation extracellulaire est unidirectionnelle. La sous-population 1 produit la molécule de signalisation auto-inductrice ComX qui induit la production de surfactines. Cette nouvelle molécule de signalisation est perçue par la sous-population 2, ce qui entraîne la production de la matrice extracellulaire. Les cellules de la sous-population 1, productrices de surfactines, ne sont pas capables de réintégrer le signal et de produire la matrice extracellulaire. De la même façon, les cellules de la sous-population 2, réceptrices de surfactines et productrices de matrice extracellulaire, ne peuvent pas répondre à la molécule signal ComX et ne pourront pas devenir des cellules productrices de surfactines (González-Pastor, 2011).

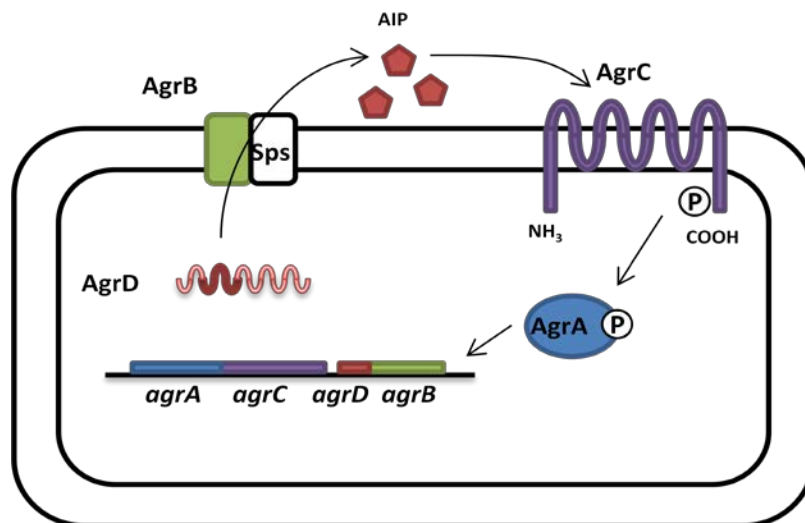


Figure 24. Représentation du système de communication Agr de *L. monocytogenes*. Le propeptide AgrD est mûré (hydrolyse des extrémités N-terminale et C-terminale par la protéase Sps et la protéine AgrB, respectivement) et sécrété vers le milieu extracellulaire par la protéine transmembranaire AgrB. Les AIPs produits interagissent avec le récepteur AgrC qui induit la phosphorylation du domaine de transmission. Le résidu phosphate est ensuite transféré au régulateur transcriptionnel AgrA qui active la transcription des gènes de l'opéron *agrBDCA* (Garmyn *et al.*, 2009).

diversité de phénotype pourrait également répondre à une stratégie de minimisation des risques (stratégie dite « bet-hedging ») qui faciliterait la survie des populations bactériennes face à des modifications des conditions environnementales (Veening *et al.*, 2008, De Jong *et al.*, 2010).

Le décryptage du fonctionnement des populations de *Bacillus subtilis* organisées en biofilm apporte des preuves expérimentales à ce caractère multicellulaire. En effet, plusieurs sous-populations aux fonctions distinctes peuvent être identifiées dans les biofilms de *Bacillus subtilis* (Figure 23) (Lopez *et al.*, 2009). Deux molécules de signalisation principales, la molécule de signalisation auto-inductrice ComX et une surfactine interviennent dans sa croissance sessile. En réponse à ComX une partie de la population produit des surfactines. Celles-ci provoquent la production de la matrice extracellulaire par une partie de la population. Une fois que les sous-populations productrices de surfactines et de matrice extracellulaire sont établies, cet état reste stable. Ainsi, les cellules productrices de surfactines ne répondent pas à ce signal et donc ne produisent pas la matrice extracellulaire. De la même façon, les cellules réceptrices de surfactines et productrices de matrice extracellulaire ne peuvent pas répondre à la molécule signal ComX et ne pourront pas devenir des cellules productrices de surfactines. D'autres sous-populations de *B. subtilis* sont constituées de cellules (i) sporulées pour lesquelles le principal régulateur de la sporulation Spo0A est actif, et (ii) non sporulées, pour lesquelles Spo0A est inactif. Les cellules pour lesquelles Spo0A est actif entrent en sporulation et produisent des toxines qui lysent les cellules non sporulées (Spo0A inactif). La mort cellulaire des cellules non sporulées entraîne la libération de nutriments utilisables pour les cellules sporulées. Ce phénomène de cannibalisme est également régulé par ces molécules signal et, dans son ensemble, le système fonctionne comme un dispositif paracrine (González-Pastor, 2011). Ainsi, dans une population isogénique, les cellules présentent un phénotype et des fonctions différentes.

4.3. La communication cellulaire chez *L. monocytogenes*

4.3.1. Le système Agr

Le système de communication Agr est le seul système de communication connu à l'heure actuelle chez *L. monocytogenes* (Figure 24). Les quatre gènes *agrBDCA* du système Agr sont présents dans le génome de *L. monocytogenes* et ont une organisation similaire à l'opéron de *S. aureus* où *agrB* code une protéine transmembranaire permettant la maturation du propeptide AgrD en un peptide autoinducteur cyclique (AIP). La détection des AIP

Lino (3)	MKNMKS	VGKFLSRKLEE	QSMKVADSS	MSKAC	FMFV	YEPKSPFVKMQEKNE-NK----
Lmon (24)	MKNMKS	VGKFLSRKLEE	QSMKVADSS	MSKAC	FMFV	YEPKSPFVKMQEKNE-NK----
Lwes (1)	MKNMKS	VGKFLSRKLEE	QSMKVADSS	MSKAC	FMFV	YEPKSPFVKMQEKNE-NK----
Lfin (1)	MKNMKS	VGKFLSRKLEE	QSMKVADSS	MSKAC	FMFV	YEPKSPFVKMQEKTINKFKTV
Lgra (1)	MKAMNK	-VGKMLAKS	IERQSIKVADSS	SSKAC	SMFA	YEPKSPMVLKAQKKA-EK----
Sau1	MNTLFN	LFFDFITGILKN----	IGNIAA	YSTC	DFIM	DEVEVPKELTQLHE-----
Sau4	MNTLLN	IFFDFITGVLKN----	IGNVAS	YSTC	YFIM	DEVEVPKELTQLHE-----
Sau3	MKKLLN	KVIELLVDFNS----	IGYRAAY	INC	DFLL	DEAEVPKELTQLHE-----
Sau2	MNTLVN	MFFDFIIKLAKA----	IGIVG	GVNAC	SSLF	DEPKVPAELTNLYDK-----

Figure 25. Alignement des séquences des propeptides AgrD de plusieurs espèces de *Listeria* et de *Staphylococcus*. Abréviations : Lino, *L. innocua* ; Lmon, *L. monocytogenes* ; Lwes, *L. welshimeri* ; Lfin, *L. monocytogenes* Finland ; Lgra, *L. gravi* ; Sau, *S. aureus*. Entre parenthèses figure le nombre de génome disponible. Surligné en rouge, le résidu cystéine conservé nécessaire pour la formation du cycle thiolactone de l'AIP. Encadré en noir, le possible AIP (Garmyn *et al.*, 2009).

extracellulaires par l'histidine kinase AgrC induit une régulation transcriptionnelle par activation du régulateur AgrA.

Les gènes *agrBDCA* présentent un haut niveau de conservation au sein du genre *Listeria*, notamment en ce qui concerne la protéine AgrD. Chez les bactéries du genre *Listeria*, à l'exception de *L. grayi*, la séquence primaire d'AgrD révèle qu'il n'y aurait qu'un seul type d'AIP (Figure 25) possédant un résidu cystéine à l'origine de la formation d'un cycle thiolactone nécessaire à l'activité de l'AIP (Nakayama *et al.*, 2009).

Contrairement au système Agr de *S. aureus*, la présence de RNAIII n'a pas été mise en évidence dans les génomes de *Listeria* (Autret *et al.*, 2003).

4.3.2. Rôle connu du système Agr

A ce jour, le nombre d'études portant sur la compréhension des rôles du système Agr dans la biologie de *L. monocytogenes* reste limité.

Vie intracellulaire et infection de l'Hôte

Des approches de génétique inverse (délétion du cadre de lecture du gène *agrD* (Riedel *et al.*, 2009) ou *agrA* (Williams *et al.*, 2005)) ou d'inactivation par transposition (interruption d'*agrA* (Autret *et al.*, 2003)) apportent des informations, parfois contradictoires, sur la connexion entre le système Agr et la virulence de *L. monocytogenes*.

Dans les résultats obtenus par Williams *et al.*, la délétion d'*agrA* n'influence pas la production des facteurs de virulence LLO et Pc-PLC, ou encore la capacité d'invasion *in vitro* (fibroblaste Cos1, macrophage J774 et Caco-2). Autret *et al.* ont également montré que la production d'ActA et de Pc-PLC n'est pas altérée chez le mutant Δ *agrA*. Seule une légère réduction de la sécrétion de la LLO a été observée lors de la phase exponentielle de croissance (Autret *et al.*, 2003). Aucune réduction n'est cependant visible en phase stationnaire, ce qui suggère la régulation de l'expression des protéines extracellulaires par Agr lors de la phase exponentielle de croissance. De la même façon, *in vitro*, la pénétration et la multiplication intracellulaire dans les cellules épithéliales (Caco-2) et les hépatocytes (HepG-2) ne sont pas altérées chez le mutant déficient pour AgrA (Autret *et al.*, 2003). A l'inverse, dans l'étude réalisée par Riedel *et al.*, le mutant Δ *agrD* montre un phénotype de virulence altéré. Cette étude montre que la capacité d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales Caco-2 est diminuée pour le mutant Δ *agrD* (Riedel *et al.*, 2009). Cette observation est à corrélérer avec la faible quantité de protéine InlA détectée dans les parois cellulaires du mutant Δ *agrD*. De plus, une diminution de l'expression du régulateur PrfA est notable chez le mutant déficient

pour *agrD* (Riedel *et al.*, 2009). Les auteurs concluent à un défaut de régulation de l'expression des gènes de virulence chez le mutant $\Delta agrD$. *In vivo*, l'infection de la souris par le mutant $\Delta agrD$ est également réduite. Ces études laissent présumer que le système Agr induit des changements physiologiques chez *L. monocytogenes* qui impactent la virulence.

Adhésion aux surfaces abiotiques et croissance sessile

Le rôle potentiel du système Agr dans l'adhésion de *L. monocytogenes* aux surfaces et dans la formation de biofilm a aussi fait l'objet d'études (Rieu *et al.*, 2007, Kumar *et al.*, 2009, Riedel *et al.*, 2009). La caractérisation de mutants de délétion ($\Delta agrA$ et $\Delta agrD$) a permis de démontrer que ce système est important aux stades initiaux de la formation de biofilm (Rieu *et al.*, 2007). Dans cette étude, l'adhérence des cellules des mutants $\Delta agrA$ et $\Delta agrD$ est altérée et se traduit respectivement par une diminution de 62 et 58% du nombre de cellules adhérant à la surface de verre par rapport à la souche parentale (Rieu *et al.*, 2007). Ceci fut confirmé par l'observation en microscopie confocale de souches *Pagr-gfp* reportrices (Rieu *et al.*, 2008). De façon similaire, la formation de biofilm sur du polystyrène est affectée pour les mutants $\Delta agrA$ et $\Delta agrD$ durant les 24 premières heures d'incubation (Rieu *et al.*, 2007, Riedel *et al.*, 2009). Dans ces études, les mutations n'affectent pas la formation de biofilm mature. En revanche, l'étude menée par Kumar *et al.* montre un défaut de développement de biofilm mature pour le mutant $\Delta agrA$ (Kumar *et al.*, 2009). Il est toutefois difficile de comparer ces études du fait des différences des conditions expérimentales. Le milieu, la température et le temps d'incubation diffèrent pour chacune des études. Malgré tout, aux températures (ambiante, 25°C et 30°C) et milieux (TSB, BHI, BHI dilué 10 fois, TSB additionné d'extrait de levure) testés, la mutation du système Agr limite l'adhésion et la formation de biofilm de *L. monocytogenes*. Par contre à 37°C, le phénotype est inversé. La quantité de biofilm est plus importante lorsque le système Agr n'est pas fonctionnel (Garmyn *et al.*, 2012). Cette observation tend à indiquer que la délétion du régulateur transcriptionnel AgrA entraîne un important défaut de régulation aboutissant en un bouleversement physiologique.

Des approches de transcriptomique différentielle ont permis de définir des cibles du système Agr et de déterminer son importance dans la physiologie de *L. monocytogenes*. Ces études ont comparé les profils d'expression de mutants délétés du gène codant le régulateur transcriptionnel AgrA (Garmyn *et al.*, 2012) ou le propeptide AgrD (Riedel *et al.*, 2009) à ceux de la souche parentale *L. monocytogenes* EGD-e. La délétion d'*agrD* résulte en un changement global de l'expression des gènes. Durant la phase exponentielle, à la température

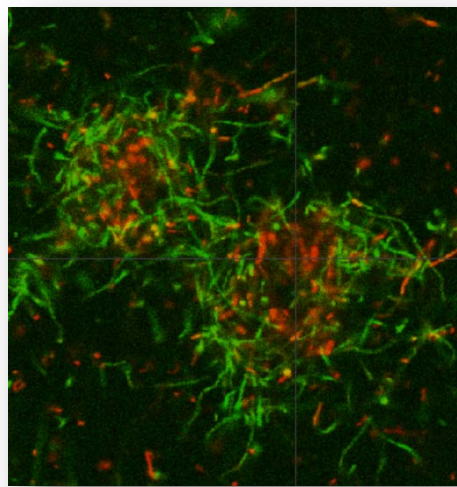


Figure 26. Observation en microscopie confocale de l'hétérogénéité d'un biofilm formé par *L. monocytogenes* EGD-e. Les cellules vertes à l'extérieur des microcolonies (*gfp*-on) expriment le système Agr alors que les cellules rouges localisées à l'intérieur (*gfp*-off) ne l'expriment pas (Rieu *et al.*, 2008).

in vivo de 37°C, 121 gènes appartenant à des catégories fonctionnelles diverses ont un taux de transcrits significativement différent chez le mutant $\Delta agrD$. De façon intéressante, une grande partie de ces gènes codent des protéines régulatrices (58 gènes) (Riedel *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été observés avec le mutant $\Delta agrA$ (Garmyn *et al.*, 2012). Pendant la croissance exponentielle à 37°C, 712 gènes différemment exprimés ont été identifiés chez ce mutant dont une partie code des protéines régulatrices et des protéines impliquées dans la virulence (notamment les internalines) (Garmyn *et al.*, 2012). Ces premiers résultats suggèrent que le système Agr joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes de *L. monocytogenes*. La température est un signal environnemental critique pour l'adaptation *in vivo*. La comparaison des transcriptomes à 37°C et 25°C a permis d'évaluer l'impact de la température sur la régulation associée à AgrA (Garmyn *et al.*, 2012). L'inactivation d'*agrA* conduit à un remaniement important du transcriptome à 37°C alors que les différences sont plus faibles à 25°C (Garmyn *et al.*, 2012). D'un point de vue phénotypique, dans le milieu complexe TSB et dans le milieu chimiquement défini KRM incubés à 37°C, ceci se traduit par un taux de croissance et une formation de biofilm plus importante chez le mutant $\Delta agrA$ par rapport à la souche parentale.

D'une manière plus globale, toutes ces études laissent présumer que le système Agr intervient dans la régulation de fonctions biologiques permettant à *L. monocytogenes* de s'adapter aux divers environnements qu'elle rencontre.

4.3.3. Hétérogénéité de l'expression du système Agr

Comme discuté de façon générale dans les sections précédentes, l'expression du système Agr dépend non seulement de la concentration en peptide autoinducteur, mais également de l'état physiologique des cellules, de la nature du milieu de culture ainsi que des conditions d'incubation (température et vitesse du flux). L'utilisation de techniques optiques combinées à l'utilisation de souches *Pagr-gfp* reportrices a permis de mettre en évidence *in situ* le caractère hétérogène de l'expression du système Agr au cours de la croissance de *L. monocytogenes* EGD-e dans des systèmes fermés ou en présence d'un flux de milieu. En condition statique, seul 1% des cellules d'un biofilm de 48h exprime la Gfp alors qu'en condition dynamique, jusqu'à 80% des cellules peuvent l'exprimer. Cette expression est étonnamment localisée dans les régions superficielles du biofilm (Figure 26) où la concentration en AIP ne devrait pas être maximale (Rieu *et al.*, 2008). De la même façon, en milieu de phase exponentielle, 15% des cellules expriment la Gpf contre 85% qui ne l'expriment pas alors qu'en fin de phase exponentielle le pourcentage de cellules exprimant la

Gfp atteint 28% de la population (Garmyn *et al.*, 2011). De plus, le pourcentage de cellules *gfp*-on augmente dans les milieux pauvres en nutriment mais diminue dans les milieux riches tels que le BHI et le TSB enrichi en glucose. Finalement, une augmentation est aussi rapportée lorsque les cellules sont incubées à 37°C. Le pourcentage de cellule *gfp*-on atteint alors 49% de la population (Garmyn *et al.*, 2011).

Ces résultats suggèrent que la réponse des populations de *L. monocytogenes* aux fluctuations environnementales n'est pas uniforme et que des sous-populations phénotypiques composent les populations de *L. monocytogenes*. L'hétérogénéité intra-clonale des populations de *L. monocytogenes* pourrait par exemple apporter une certaine adaptabilité face aux changements des conditions environnementales et/ou compartimenter des fonctions.

4.4.4. Production d'AI-2 chez *L. monocytogenes* : Un système de détoxification

Chez *L. monocytogenes*, un orthologue de *luxS* (*lmo1288*) a été identifié. Sa fonctionnalité et la production d'AI-2 par *L. monocytogenes* ont été confirmées (Challan Belval *et al.*, 2006, Sela *et al.*, 2006). Ces études montrent qu'une souche mutée du gène *luxS* est affectée quant à sa capacité à former des biofilms. L'ajout d'AI-2 dans le milieu ne restaure cependant pas le phénotype. Néanmoins, l'addition de S-ribosyl homocysteine (SRH) dans le milieu de culture de la souche parentale induit un phénotype similaire au mutant *luxS*. Le phénotype du mutant n'est donc pas lié à l'absence d'AI-2 mais à l'accumulation du SRH. Cette étude montre que chez *L. monocytogenes*, l'AI-2 n'est pas une molécule de signalisation et que LuxS intervient uniquement dans la voie de détoxification de métabolites toxiques.

Objectifs de la Thèse

Les informations relatives à l'écologie de *L. monocytogenes* dans le sol restent limitées. L'objectif général de ce travail était de préciser la place des comportements sociaux dans la persistance des populations de *L. monocytogenes* dans le sol. Ainsi, nous nous sommes intéressés au système de communication Agr et aux conséquences de son inactivation sur la dynamique des populations de *L. monocytogenes* dans des microcosmes de sol en présence ou en absence de la fraction biotique du sol. Expérimentalement, l'approche a combiné le suivi des populations par dénombrement, la comparaison des états physiologiques entre souche parentale et souche mutante par transcriptomique différentielle et l'évaluation de la compétitivité des souches après co-inoculation.

Plusieurs études ont été mises en place :

- La première étude vise à étudier le rôle du système de communication Agr et du régulateur transcriptionnel AgrA dans l'adaptation de *L. monocytogenes* au sol. Pour cela deux approches ont été utilisées. Une approche de génétique inverse pour déterminer si la délétion du régulateur AgrA impacte la survie du mutant par rapport à la survie de la souche parentale, et une approche de transcriptomique différentielle pour comparer les taux de transcrits des deux souches lors de leur adaptation au sol.
- Le deuxième point important de ma thèse a été d'étudier le rôle du système Agr dans une perspective sociomicrobiologique en évaluant l'importance du système Agr pour la compétitivité de *L. monocytogenes* dans le sol. Dans cette optique, des tests de compétitivité en microcosme de sol ont été mis en place avec deux mutants de délétion du système Agr, $\Delta agrA$ et $\Delta agrD$, et la souche parentale.
- Finalement, la troisième étude a permis d'étudier l'impact du microbiote tellurique sur la survie et la persistance de *L. monocytogenes* dans le sol grâce à une approche d'écologie microbienne visant à corrélérer la diversité et la composition des communautés microbiennes à la dynamique des populations de *L. monocytogenes* dans des microcosmes de sol dont la diversité microbienne a été graduellement diluée jusqu'à extinction.

Chapitre 2

La survie de *Listeria monocytogenes* dans le sol nécessite une régulation par AgrA

Anne-Laure Vivant, Dominique Garmyn, et Pascal Piveteau. (soumis, **Environmental Microbiology**). Survival of *Listeria monocytogenes* in soil requires AgrA-mediated regulation

1. Avant-propos

L'étude bibliographique présentée dans le chapitre précédent, a permis de réaliser une synthèse des principales informations relatives à l'écologie de *L. monocytogenes* dans le sol. Les populations de *L. monocytogenes* sont soumises dans l'environnement à de nombreuses contraintes. Pour y faire face et survivre dans l'environnement tellurique, *L. monocytogenes* doit être capable d'intégrer les signaux environnementaux et de répondre de façon concertée afin d'ajuster sa physiologie.

Comme décrit dans l'introduction bibliographie, le système Agr de *L. monocytogenes* est impliqué dans l'adhésion aux surfaces abiotiques (Rieu *et al.*, 2007), dans les premières étapes de formation des biofilms (Rieu *et al.*, 2007, Riedel *et al.*, 2009) et pendant l'infection des hôtes (Autret *et al.*, 2003, Riedel *et al.*, 2009). Cependant, le rôle du système Agr dans l'adaptation des populations de *L. monocytogenes* dans l'environnement naturel et spécifiquement dans l'environnement tellurique n'est pas décrit. Ce chapitre sera donc un volet mécanistique consacré au régulateur transcriptionnel AgrA et aux gènes qu'il régule au cours de l'adaptation de *L. monocytogenes* dans le sol.

Ainsi, afin de mieux comprendre le rôle du système Agr et du régulateur AgrA durant l'adaptation de *L. monocytogenes* au sol, nous avons étudié l'évolution de la souche parentale et du mutant de délétion $\Delta agrA$, inoculés dans des microcosmes de sol, en présence ou non du microbiote indigène du sol. Nous avons par la suite utilisé une approche transcriptomique différentielle pour évaluer l'impact de la délétion du gène *agrA* sur le transcriptome de *L. monocytogenes* dans le sol.

Survival of *Listeria monocytogenes* in soil requires AgrA-mediated regulation

Anne-Laure Vivant^{1,2}, Dominique Garmyn^{1,2} and Pascal Piveteau^{1,2*}

¹Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

²INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

*Corresponding author. INRA, UMR1347 Agroécologie, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France.

E-mail: piveteau@u-bourgogne.fr

Running title: AgrA promotes *L. monocytogenes* soil adaptation

2. Abstract

In this study, we investigated the role of the response regulator AgrA during adaptation of *Listeria monocytogenes* in soil. The fate of the parental strain *L. monocytogenes* L9 (Rifampicin resistant mutant of *L. monocytogenes* EGD-e) and a $\Delta agrA$ deletion mutant were compared in soil microcosms either in the presence (biotic soil) or absence (sterilised soil) of the soil microbiota. The $\Delta agrA$ mutant displayed significantly reduced survival in biotic soil microcosms and differential transcriptome analyses showed large alterations of the transcriptome when AgrA was not functional. Indeed, in biotic soil environments, 578 coding genes and an extensive repertoire of ncRNA were differentially transcribed. Transcription of genes coding proteins involved in cell envelope and cellular processes, including PTS system and ABC transporter, and proteins involved in resistance to antimicrobial peptides was affected. These results suggest that the response regulator AgrA of the Agr communication system play important roles during the saprophytic life of *L. monocytogenes* in soil.

3. Introduction

L. monocytogenes is the causative agent of listeriosis, a serious food-borne infection affecting essentially immuno-compromised individuals, the elderly and pregnant women (Cossart & Toledo-Arana, 2008). The pathogen is largely spread in the environment. It has been isolated from water systems (De Luca *et al.*, 1998, Garrec *et al.*, 2003, Lyautey *et al.*, 2007b), vegetation (Beuchat, 1996), soil (Welshimer, 1960, Weis & Seeliger, 1975), farms (Nightingale *et al.*, 2004, Latorre *et al.*, 2009, Moshtaghi *et al.*, 2009, Latorre *et al.*, 2010), food industries (Goulet *et al.*, 1998, Garrido *et al.*, 2009, van Houdt & Michiels, 2010) and faeces of animals (Fenlon, 1985, Iida *et al.*, 1991, Ho *et al.*, 2007).

Environmental adaptation requires the ability to integrate environmental cues in order to adapt the cell's physiology to the surrounding conditions through regulation of gene expression. Genomics showed that an important part of *L. monocytogenes* genome (7.3%) is dedicated to regulation including 209 transcriptional regulators, 15 histidine kinases and 16 response regulators constituting two-component systems (Glaser *et al.*, 2001). Two-component systems participate to the ability of prokaryotes to sense and respond to fluctuating environmental conditions. AgrC/AgrA is a two-component regulatory system part of the Agr communication system. Initially described in *Staphylococcus aureus*, this communication system is organized as a four genes operon *agrBDCA*. AgrB is a membrane-bound protein that processes the propeptide AgrD into a mature autoinducing peptide (AIP).

Detection of AIP by the histidine kinase AgrC induces transcriptional regulation through activation of the regulator AgrA. Detailed data concerning the role of the Agr system on the physiology of *S. aureus* are available (Yarwood *et al.*, 2004, Novick & Geisinger, 2008, Queck *et al.*, 2008). So far, its role in the adaptation of *L. monocytogenes* to its environment is only partially understood (Garmyn *et al.*, 2009). Reports suggest that the Agr communication system of *L. monocytogenes* is involved in adhesion to abiotic surfaces (Rieu *et al.*, 2007), in the early stages of biofilm formation (Rieu *et al.*, 2007, Riedel *et al.*, 2009) and during infection of the mammalian host (Autret *et al.*, 2003, Riedel *et al.*, 2009). Indeed, Δ agrA and Δ agrD in-frame deletion mutants showed defects in adherence and early biofilm development. Virulence of a Δ agrA mutant was attenuated in mice but not *in vitro* in cell lines (Autret *et al.*, 2003) while virulence in mice and invasion of Caco-2 intestinal cells was reduced in an agrD mutant (Riedel *et al.*, 2009). This was correlated with a lower expression of Internalin. However, the role of the Agr communication system in adaptation of *L. monocytogenes* populations in the natural environment and especially in soil has not been described.

In order to gain a better understanding of the role of the transcriptional response regulator AgrA and the Agr communication system during adaptation of *L. monocytogenes* to the telluric environment, we monitored the fate of inoculated *L. monocytogenes* parental and in-frame Δ agrA deletion mutant in soil microcosms in the presence and absence of indigenous soil microflora. We further investigated the consequences of inactivation of AgrA on the transcriptome of *L. monocytogenes* during adaptation to the soil environment through a differential transcriptomic analysis approach.

4. Materials and methods

4.1. Bacterial strains and inoculum preparation

Rifampicin resistant mutants of the parental strain *L. monocytogenes* EGD-e and Δ agrA in-frame deletion mutant DG125A (Rieu *et al.*, 2007), respectively *L. monocytogenes* L9 (Lemunier *et al.*, 2005) and *L. monocytogenes* DG125A6 (this study), were used. *L. monocytogenes* DG125A6 was isolated on Polymyxin-Acriflavin-Lithium-Chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol agar (PALCAM; AES chemunex, Bruz, France) supplemented with 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ rifampicine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) according to Lemunier *et al.* (Lemunier *et al.*, 2005). This Rif^R mutant was selected as its

growth rate during planktonic growth and its ability to grow as biofilm in trypton soy broth (TSB; AES chemunex, Bruz, France) at 25°C without shaking was similar to those recorded with the parental strain.

A working stock stored at -80°C was used throughout the study. Strains were grown statically at 25°C for 16h in 5ml of TSB. Three independent inocula were prepared by inoculating 10 ml of TSB to an O.D_{600nm} of 0.04 and incubating statically at 25°C until the O.D_{600nm} reached 0.4. Cultures were then centrifuged at 8000 g for 5 minutes at room temperature and pellets were suspended in NaCl (0.85%).

4.2. Soils characteristics and preparation of microcosms

Ten soils were sampled in France in the Burgundy section of a country-wide soil sampling network based on a 16 x 16 km systematic grid (Arrouays *et al.*, 2002). Twenty-five individual core samples of topsoil (0–30 cm) were taken using a sampling design within an area of 20 x 20 m. At each sampling site, the core samples were mixed into a composite sample. Soil samples were sieved to 5 mm and stored at 4°C before analysis. Soil's attributes such as pedology, chemistry and land use extracted from the DONESOL database (Grolleau *et al.*, 2004) and the bacterial abundance are listed in Table 1. Physical and chemical analyses were performed by the Soil Analysis Laboratory of INRA (Arras, France, <http://www.lille.inra.fr/las>). Aliquots of soils were heat sterilized three times (120°C, 20 min) with a period of 24 hours between each autoclaving treatment. For each soil, fifty g of sterilized and non sterilized soil were packed in triplicate to constitute sterilized and biotic soil microcosms.

Sterilized and biotic soil extracts were prepared for microarray experiments. Sterilized soil extracts were prepared according to Piveteau *et al.* (Piveteau *et al.*, 2011). Briefly, 500 g of soil were mixed in 750 ml of water for 30 minutes at 120 rpm and autoclaved 1 hour at 130°C. Soil suspensions were centrifuged at 10 000 g for 20 minutes and supernatants were filtered on Whatman paper (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The particle-free soil extract obtained was used after autoclaving (20 min, 120°C). Biotic fraction was prepared by blending one hundred g of soil in 300 ml of water for 1.5 minutes in a Waring blender. To estimate the bacterial abundance of the biotic fraction, culturable bacterial communities were enumerated by serial plating on nutrient agar (3 g.l⁻¹ beef extract, 5 g.l⁻¹ peptone, 15 g.l⁻¹ agar) supplemented with 100 µg.ml⁻¹ cycloheximide (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) to suppress fungi. Biotic soil extracts were prepared by adding one

ml of the biotic fraction into 9 ml of sterilized soil extract in order to reach a final concentration of 2.10^7 cultivable CFU/ml.

4.3. Soil microcosm invasion assays

Biotic and sterilized soil microcosms were inoculated to a final concentration of 2.10^6 CFU/g of soil in order to reach a final soil moisture of 60% water-holding capacity (WHC). Soil microcosms were then incubated in the dark at 25°C. Dynamics of *L. monocytogenes* populations in soil microcosms were followed immediately after inoculation and periodically over a 14-days period by serial plating either on selective PALCAM agar (AES chemunex, Bruz, France) supplemented with $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ cycloheximide and $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ rifampicine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) or Trypton soy agar (TSA, AES chemunex, Bruz, France) for sterilised soil microcosms.

4.4. RNA extraction and cDNA synthesis

Inocula were prepared as previously described except that pellets were suspended in 10 ml of sterilized or biotic soil extracts. Inoculated soil extracts were incubated statically at 25°C for 30 minutes. RNAs were immediately stabilised by treating the bacterial cultures with RNAprotect bacterial reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Three independent replicates were prepared per condition.

Bacteria were harvested by centrifugation at 8000 g for 5 minutes at room temperature. Pellets were suspended in 700 μl of RLT buffer supplemented with β -mercaptoethanol (1%) and 0.2 g of RNase-free glass beads (100 μm). Cells were mechanically disrupted in a Fast Prep (MP Bio, Illkirch Graffenstaden, France) during 3 cycles (4 m.s^{-1} , 30 s). Cell debris were discarded by centrifugation at 7000 g for 5 minutes at 4°C. Potassium acetate (3M, pH 5.5) was added to the supernatants (10%) and the mixture was incubated on ice for 10 minutes and centrifuged at 14 000 g for 5 minutes at 4°C. The aqueous phase was then precipitated with an equal volume of cold isopropanol (-20°C), washed and dried. Pellets were suspended in 400 μl of RNase-free water and purified first of all on polyvinyl polypyrrolidone (PVPP; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) columns, then on Phase Lock GelTM (5PRIME, Dominique Dutscher, Brumath, France) and finally on Qiagen RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturers' protocols. Purified RNA was concentrated with Qiagen RNeasy MinElute cleanup kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions.

Complementary DNA strands were then synthesized using TransPlex[®] Complete Whole Transcriptome Amplification Kit (WTA2, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions. The cDNA concentration was determined spectrophotometrically by measuring the λ_{260} and λ_{280} ($\lambda_{260} = 1.0 = 50 \mu\text{g DNA/ml}$, $\lambda_{260}/\lambda_{280} > 1.8$).

For each condition, three sets of cDNAs were prepared from three sets of RNAs extracted from three independent biological repetitions and hybridized independently.

4.5. Whole-genome microarrays and data analysis

A customized whole-genome microarray including the 2857 annotated open reading frames (ORFs) of the genome of *L. monocytogenes* EGD-e was designed by NimbleGen Systems. A total of 13456 probes were dedicated to the tiling of intergenic regions every 14 bp. Microarray hybridization, washes, raw data pre-processing and normalization were performed by Partnerchip (Evry, France) according to Nimblegenes standard protocols. DNASTAR ArrayStar software (Madison, WI) was used for the analysis of normalized results. T statistics and P-values ($P < 0.05$) were calculated to determine differentially expressed genes. The fold change between the two strains was calculated by comparing expression levels under the same incubation conditions. Genes with at least 2-fold change were considered for interpretation. In order to identify relationships between genes and biological functions, gene ontology was subsequently searched. P-values and Z-Scores were calculated in order to determine the chance that a certain number of genes will be selected for any given gene ontology term.

Informations regarding intergenic regions (location, presence of ncRNA) were retrieved from the web-accessible transcriptome browser (http://www.weizmann.ac.il/molgen/Sorek/listeria_browser/) provided with the publication of Wurtzel *et al.* (Wurtzel *et al.*, 2012).

4.6. Quantitative PCR

In order to confirm fold changes in gene expression observed in the microarray analyses, transcript levels of several genes with higher and lower transcript levels were examined by quantitative PCR (qPCR) using Absolute qPCR SYBR Green ROX mix (Thermo Scientific; Dominique Dutscher, Brumath, France). Specific primers for each selected gene were designed (Table S1). Each reaction contained 2X Absolute qPCR SYBR Green ROX mix (7.5 μl), 0.6 μM of each PCR primers (1 μl each), sterile water (3 μl), and

Table 1. Characteristics of the soils used in this study: land-use, soil parameters and bacterial abundance.

Soil	Land-use ^(a)	Texture	pH	Organic C (g.kg ⁻¹)	Organic N (g.kg ⁻¹)	C/N	CEC ^(b)	WHC ^(c) (%)	Bacteria (10 ⁷ UFC.g ⁻¹)
748	AF	Silt loam	8.2	9.80	1.0	9.8	13.2	18.5	5.1
749	AF	Clay loam	8.0	19.2	1.8	10.7	16.6	24.4	5.2
750	AF	Clay	8.0	26.4	2.8	9.4	37.8	42.3	3.1
907	P	Loam	5.9	25.0	2.4	10.4	11.6	20.7	4.1
909	AF	Silty clay	8.1	27.5	2.8	9.8	29.5	34.2	10.0
911	P	Silty clay	5.9	38.1	3.7	10.3	23.6	40.7	2.6
1003	F	Silty clay	7.5	33.4	2.3	14.5	27.3	36.1	4.4
1005	P	Clay	6.7	35.3	3.9	9.1	31.4	46.6	6.0
1051	P	Sandy loam	5.4	26.2	2.5	10.5	8.8	18.8	4.4
1224	AF	Clay	7.8	25.6	2.5	10.2	27.4	37.6	3.1

^(a) AF Agricultural Field, P Prairie, F Forest ^(b)cation exchange capacity. ^(c)water-holding capacity

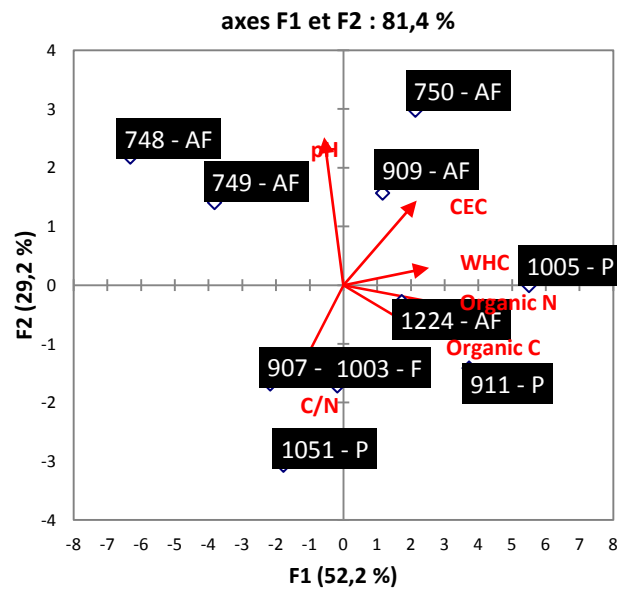


Figure 1 (à gauche). Principal components analysis (PCA) of soils. The length and direction of the lines represent the contribution of each parameter. The numbers indicate soils' nomenclature and the letters whether soils are from an agricultural field (AF), a prairie (P) or a forest (F).

12.5 ng of DNA template (2.5 µl) added to a final volume of 15 µl. The qPCR reactions were carried out in a Step One™ real-time PCR system (Applied Biosystems) using the following program: an initial enzyme activation period (10 min at 95°C), followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C.

Following PCR, absolute quantification of gene expression was determined by mean of a standard curve method and fold-changes were calculated as the ratio between the two strains of the absolute quantity of the target gene determined under the same incubation conditions.

4.7. Statistical analyses

The repeated-measures analysis of variance (repeated-measures ANOVA) was used to compare survival patterns of *L. monocytogenes* parental and $\Delta agrA$ mutant populations in soil microcosms. Principal components analysis was used to investigate relationships between soil characteristics and the dynamics of *L. monocytogenes* populations. Differences of soils' texture were represented with the United States Department of Agriculture (USDA) pedological classification system using the statistical software R (v 2.14.1).

5. Results

5.1. *L. monocytogenes* population dynamics are affected by the deletion of *agrA* in all biotic soil microcosms but not in sterilized soil microcosms

The dynamics of *L. monocytogenes* populations in biotic and sterilized soil microcosms prepared from soils for which land-use and edaphic parameters were different (Table 1 and Figure 1) was recorded over a 14-d period. In half of the sterilized soil microcosms (748, 750, 909, 1005 and 1224), growth was recorded and both strains evolved similarly (Figure 2a). Over 2 log growth was observed within the first days of incubation and the relative abundance of the population was stable until the end of the experiment. On the opposite, in the 5 other sterilized soil microcosms (749, 907, 911, 1003, and 1051) no growth was observed (Figure 2b). The abundance of both strains decreased over time in these microcosms and the population of the $\Delta agrA$ mutant exhibited a stronger decline than the parental strain.

During incubation in biotic soil microcosms, results were different. No growth was detected with any of the listerial strains and the population of the parental strain and the $\Delta agrA$ mutant declined throughout the experiment (Figure 2a and 2b). However, survival

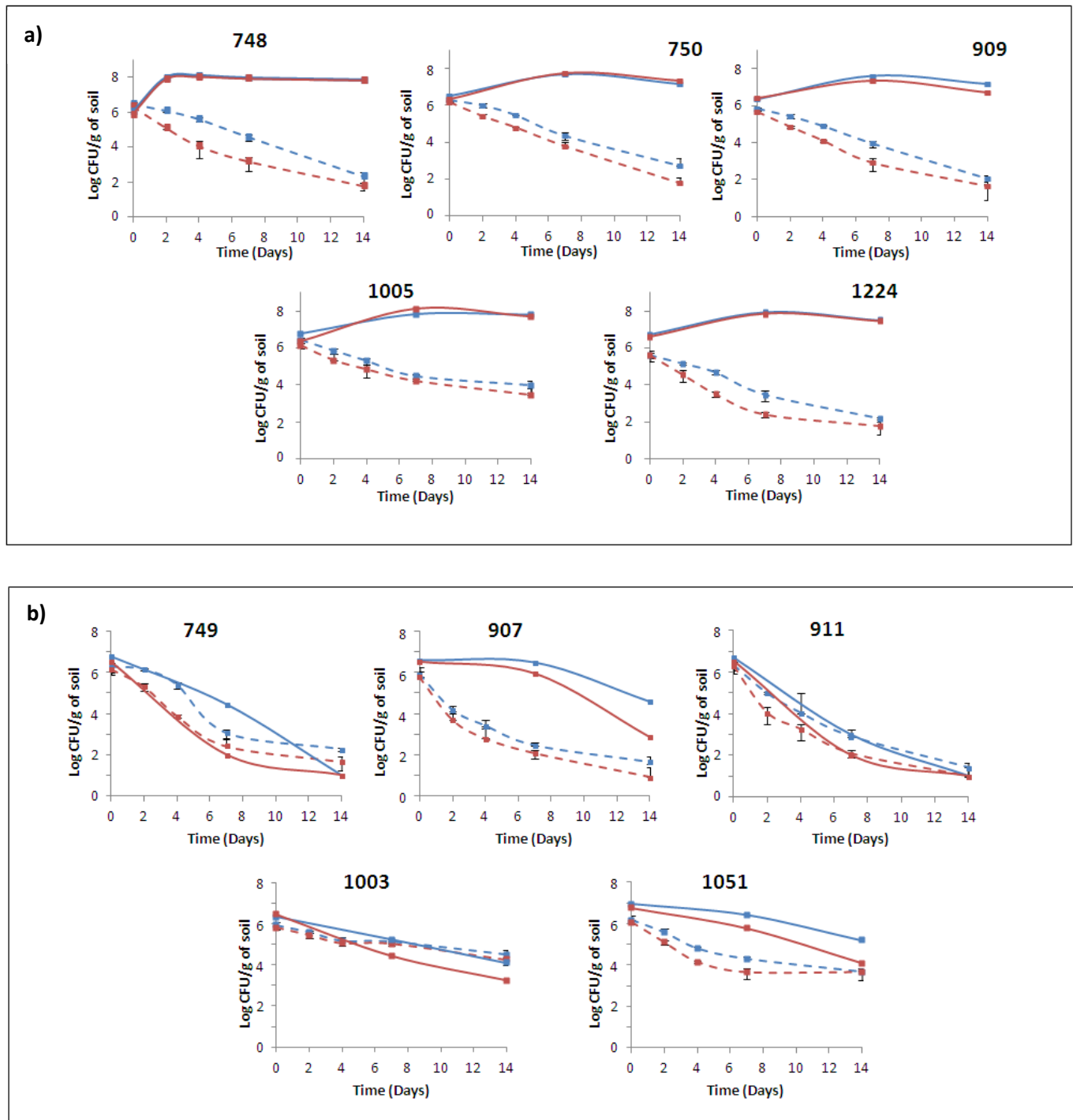


Figure 2. *L. monocytogenes* parental strain (blue lines) and $\Delta agrA$ mutant (red lines) dynamics in sterilized (plain lines) and biotic (dash lines) soils. a) Soils for which a growth has been observed in one of the environmental conditions and b) soils which does not support any listerial growth. Error bars represent standard deviation from three independent replicates.

patterns differed according to the strain under scrutiny. The population of the mutant was significantly lower than the population of the parental strain. The highest differences were recorded in soils 748, 749, 911 and 1224 for which the populations differed by over one log (repeated-measures ANOVA, $P < 0.05$). Differences at day 14 were no longer statistically significant.

Interestingly, for each strain, the abundance at the end of the experiment was statistically different according to the soil (Figure 3). Indeed, 14 days after incubation, it was significantly higher in soil 1003 (repeated-measures ANOVA, $P < 0.05$), where over 4 log of the population remained detectable, than respectively in soils 1005 and 1051 and in soils 748, 749, 750, 907, 909, 911 and 1224. A moderate survival occurred in soils 1005 and 1051. The weakest survival was observed in soils 748, 749, 750, 907, 909, 911 and 1224 where less than 3 log were detected fourteen days after inoculation. The Spearman rank correlation test was used to check correlations between the survival rate of each strain and soil's attributes parameters (texture, pH, organic C, N, ratio C/N and the cation exchange capacity). From these six metrics, a significant negative correlation was detected between the survival rate and the pH ($\rho_s = -0.736$, $P < 0.05$).

5.2. Transcriptome variations between the parental strain and the $\Delta agrA$ mutant are limited in sterilized soil environments

In order to better understand the role of the response regulator AgrA in the adaptation of *L. monocytogenes* to the telluric environment, we investigated the consequences of the deletion of *agrA* on the transcriptome of *L. monocytogenes* during adaptation to the soil environment through a differential transcriptome analysis approach. We decided to use in this study the soil 748 for which high differences of survival were recorded between the parental strain and the mutant.

In sterilized soil extract, deletion of *agrA* resulted in a limited variation of transcriptome (Figure 4). Indeed, 86 genes and 29 intergenic regions (IGR) showed significant differences in transcript levels between the $\Delta agrA$ mutant and the parental strain. Seventy-two genes had higher transcript levels in the mutant and the fold change of most of them was less than 3 (Table S2). Gene ontology identified functional categories of the intermediary metabolism 2.1.1 (specific pathways, 18 genes) and 2.5 (metabolism of coenzymes and prosthetic groups, 12 genes) as significant terms in this set of genes, for example, genes involved in glycolytic and specific pathways (*lmo0342* to *lmo0351*) (Wurtzel

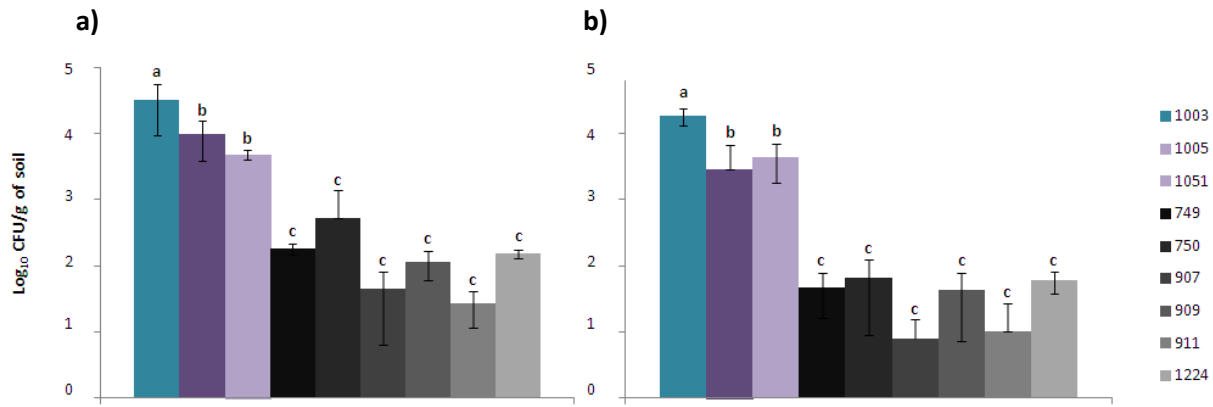


Figure 3. *L. monocytogenes* parental strain (a) and $\Delta agrA$ mutant (b) abundance after 14 days of incubation in soil microcosms. Error bars represent standard deviation from three independent replicates. Letters indicate significant differences of survival after ANOVA.

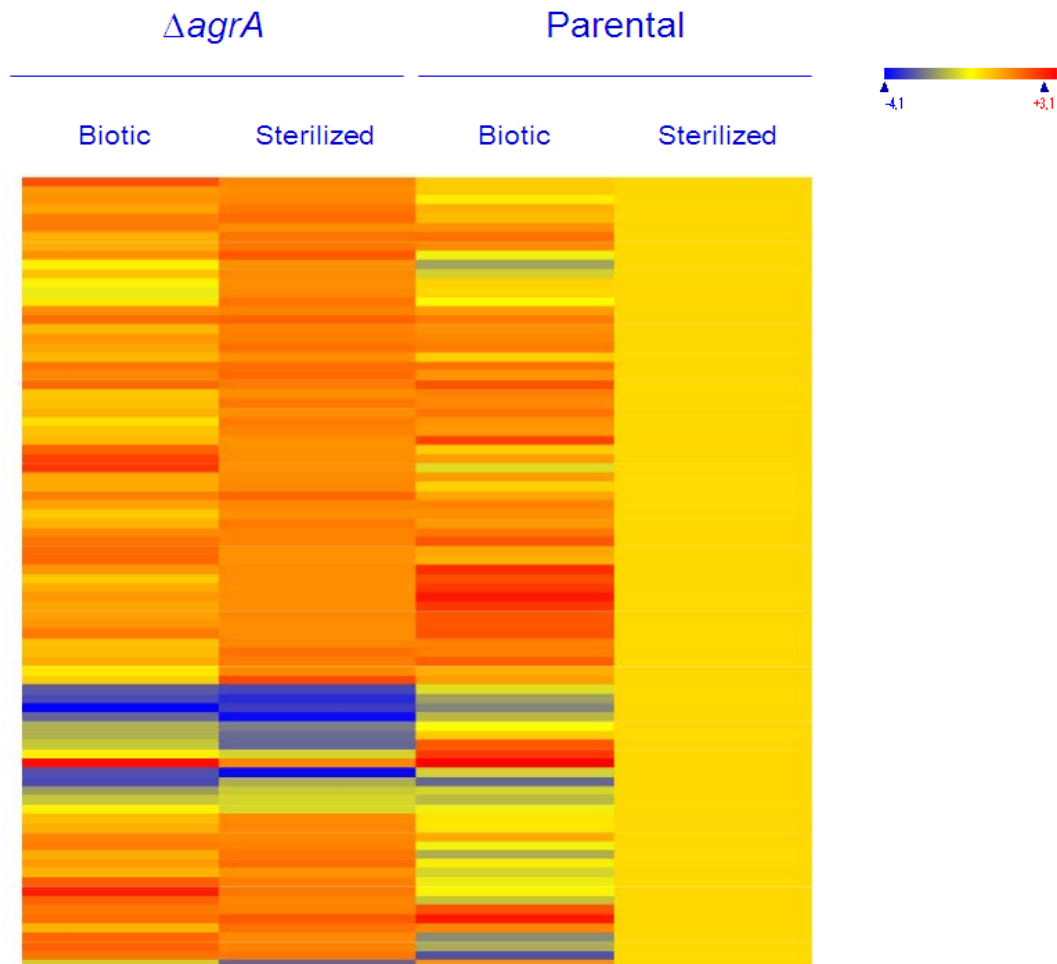


Figure 4. Heat map of the set of genes with significant differences between the $\Delta agrA$ mutant and the parental strain under sterilized soil conditions. Expression levels were standardized with “parental strain in sterilized condition” set as baseline experiment. Genes are represented in rows. Expression levels of this set of genes under biotic conditions are also presented.

et al., 2012) were represented as well as some genes coding enzymes of the cobalamin synthesis pathway (*lmo1190*, *lmo1192*, *lmo1193* and *lmo1196*).

In the set of genes with lower transcript levels (Table S2), as expected, the four genes of the *agr* operon (*agrBDCA*) were detected and the greatest fold change was detected with *agrD* (17 times lower). Moreover, the intergenic regions between *agrD* and *agrC* (52535-52629) and between *agrA* and the flanking gene *lmo0052* (54673-54838) also presented lower transcript levels. Three genes coding putative secreted proteins (*lmo0477*, *lmo0478* and *lmo0479*) were also included in the top 10 genes with lower transcript levels. They respectively varied by 16, 6 and 5. The presence of a non-coding RNA in this region of the genome has been reported (Wurtzel *et al.*, 2012). Interestingly, all entries of this set of genes except *lmo1798*, *lmo2286* and *lys A* were recorded in the set of genes with lower transcript levels during growth at 25°C in rich medium of a Δ *agrA* mutant of *L. monocytogenes* EGD-e (Garmyn *et al.*, 2012).

5.3. Presence of soil microbiota results in major differences between the parental strain and the Δ *agrA* mutant background

To gain a better insight in the impaired survival of the Δ *agrA* mutant in biotic soil microcosms, a differential transcriptome analysis was performed in biotic soil extract. Deletion of *agrA* resulted in larger variations of transcriptome (Figure 5). A total of 578 genes were differentially transcribed. Two hundred and fifty two genes were recorded in the set of genes with higher transcript levels in the Δ *agrA* mutant background (Table S3). Gene ontology did not identify any functional category as significant terms. A focus on the genes highly expressed identified a group of 122 genes with over 3 fold higher transcript levels (Table S4). Most of these genes has functions related to the metabolism of carbohydrates as *lmo2110* (mannose-6 phosphate isomerase), *lmo0347* (dihydroxyacetone kinase) or also *lmo2824* (D-3-phosphoglycerate dehydrogenase) or functions related to the transport of proteins as ABC transporter (*lmo2123* to *lmo2125*, *lmo1739*) and PTS system (*lmo2782*, *lmo2665-2666*, *lmo2780*). Fourteen transcriptional regulators are also in this set of genes.

Moreover, 328 ORFs were identified in the set of genes with lower transcript levels (Table S3). Again, *lmo0048* (*agrB*), *lmo0049* (*agrD*), *lmo0050* (*agrC*) and *lmo0051* (*agrA*) were in this set of genes with respectively 5, 4, 4 and 9 times less transcript levels in the Δ *agrA* mutant background. Most genes detected with lower transcript levels under sterile conditions in the mutant background were also detected in this set of genes. Gene ontology showed that functional categories 1.1 - 1.2 - 1.8 - 1.10 - 3.7.1 - 3.7.4 - 4.4 - 5.1 - 6.0 were

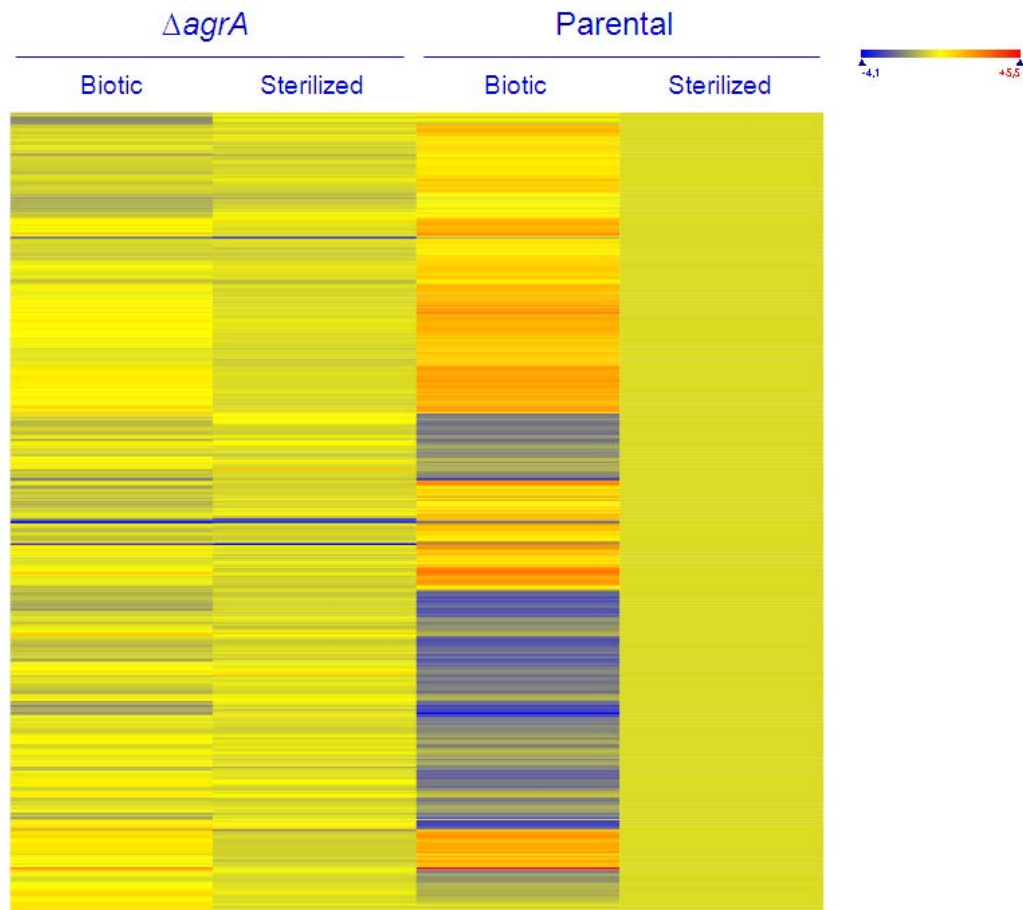


Figure 5. Heat map of the set of genes with significant differences between the $\Delta agrA$ mutant and the parental strain under biotic soil conditions. Expression levels were standardized with “parental strain in sterilized condition” set as baseline experiment. Genes are represented in rows. Expression levels of this set of genes under sterilized conditions are also presented.

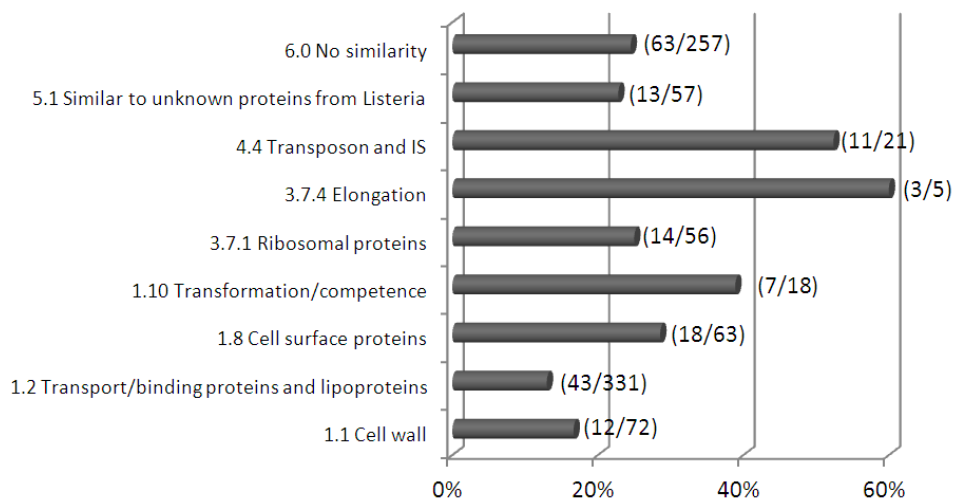


Figure 6. Functional categories identified as significant by gene ontology and percentage of genes from the set of genes with lower transcript levels in the $\Delta agrA$ mutant under biotic condition in comparison to the parental strain *L. monocytogenes* L9. In brackets is presented the number of genes with significant variation of transcript level/the total number of genes in the functional categories.

significant terms (Figure 6). Eighty genes are included in the category 1 “cell envelope and cellular process” (1.1 cell wall, 1.2 transport/binding proteins and lipoproteins, 1.8 cell surface proteins and 1.10 transformation/competence). Among these genes, the *dltABCD* operon is involved in D-alanine esterification of teichoic acid and deletion of the *dlt* operon affects adhesion to cell lines and antimicrobial peptides resistance (Abachin *et al.*, 2002). Several are also involved in PTS systems and ABC transporters. For example, *lmo2115* (*anrB*), which codes a permease component of an ABC transporter, play a role in nisin resistance and also in bacitracin, gallidermin and beta-lactam antibiotics resistance or *lmo0153*, which codes a probable ABC transporter, is a ZurR-regulated gene which is involved in virulence in the murine model (Dowd *et al.*, 2012). From functional categories 3.7 (protein synthesis) seventeen genes were identified (3.7.1. ribosomal proteins synthesis and 3.7.4. elongation). Finally, an important part of the differentially expressed genes (87 genes) are associated to other functions as transposon and IS (4.4), unknown proteins (5.1) or do not have any similarity.

5.4. A repertoire of ncRNAs is differentially transcribed in the presence of soil microbiota

In silico analysis of intergenic regions with significant differences of transcript levels between the Δ *agrA* mutant and the parental strain, highlighted a set of 41 ncRNA under biotic conditions. Their location, the flanking genes and the measured fold changes are listed in Table 2. The level of transcripts of 10 (*rliG*, *rli47*, *rli80*, *rli88*, *rli99*, *rli106*, *rli120*, *rli126*, *rli127* and *rli140*) was higher in the Δ *agrA* background and 31 were identified with a lower transcript level than in the parental strain. To date, 271 ncRNAs have been identified and annotated in the genome of *L. monocytogenes* (Mandin *et al.*, 2007, Mraheil *et al.*, 2011, Mellin & Cossart, 2012, Wurtzel *et al.*, 2012, Behrens *et al.*, 2014). Among these ncRNAs, several have been linked to biological functions. These include *rli28*, *rli32*, *rli38* and *rli50* which pairs to mRNAs whose products are potentially involved in bacterial adaptation and also in infection of mice (Toledo-Arana *et al.*, 2009); *rli31* and *rli50* are required for full virulence in murine, larvae and macrophages infection models (Mraheil *et al.*, 2011). Moreover, the SAM riboswitch *sreB* (*rli47*), which can be produced as a short transcript and act as a *trans*-regulator, negatively controls PrfA expression by pairing to the 5' UTR of the mRNA (Loh *et al.*, 2009). Finally, Mandin *et al.* predicted that the ncRNA *rliI* targets mRNA with biological functions related to sugar metabolism and transport (Mandin *et al.*, 2007).

Table 2. Location, flanking genes and fold change of the ncRNA detected as differentially transcribed between the $\Delta agrA$ mutant and the parental strain under biotic conditions.

Name	Start	Stop	5' flanking gene	3' flanking gene	Fold change
ncRNA with a significant higher transcript level					
<i>rliG</i>	2386992	2386715	<i>lmo2302</i>	<i>lmo2304</i>	2.676
<i>rli47(sreB)</i>	2226036	2226481	<i>lmo2141</i>	<i>lmo2142</i>	3.457
<i>rli80</i>	787038	787254	<i>lmo0761</i>	<i>lmo0762</i>	4.516
<i>rli88</i>	1320429	1320501	<i>lmo1292</i>	<i>lmo1293</i>	2.532
<i>rli99</i>	2395032	2395236	<i>lmo2320</i>	<i>lmo2321</i>	4.911
<i>rli106</i>	2594785	2594561	<i>lmo2515</i>	<i>lmo2516</i>	2.309
<i>rli120</i>	226546	226640	<i>lmo0219</i>	<i>lmo0220</i>	2.851
<i>rli126</i>	388707	388590	<i>lmo0360</i>	<i>lmo0361</i>	5.277
<i>rli127</i>	1473829	1473701	<i>lmo1439</i>	<i>lmo1440</i>	4.109
<i>rli140</i>	2395244	2395032	<i>lmo2320</i>	<i>lmo2321</i>	4.911
ncRNA with a significant lower transcript level					
<i>rliI</i>	2842199	2841962	<i>lmo2760</i>	<i>lmo2761</i>	2.437
<i>rli23</i>	172171	172268	<i>lmo0172</i>		2.677
<i>rli25</i>	357618	357516	<i>lmo0330</i>		2.731
<i>rli27</i>	434817	434929	<i>lmo0411</i>	<i>lmo0412</i>	2.812
<i>rli28</i>	507372	507141	<i>lmo0470</i>	<i>lmo0471</i>	3.364
<i>rli29</i>	507632	507450	<i>lmo0470</i>	<i>lmo0471</i>	2.742
<i>rli31</i>	597806	597926	<i>lmo0558</i>	<i>lmo0559</i>	2.610
<i>rli32</i>	600750	600604	<i>lmo0560</i>	<i>lmo0561</i>	2.334
<i>rli33-2</i>	708618	708860	<i>lmo0671</i>	<i>lmo0672</i>	2.501
<i>rli35</i>	855495	855393	<i>lmo0828</i>		2.642
<i>rli36</i>	859521	859412	<i>lmo0829</i>	<i>lmo0830</i>	2.261
<i>rli37</i>	907526	907832	<i>lmo0866</i>	<i>lmo0867</i>	2.395
<i>rli38</i>	1152549	1152917	<i>lmo1115</i>	<i>lmo1116</i>	2.495
<i>rli40</i>	1275794	1275547	<i>lmo1251</i>	<i>lmo1252</i>	2.062
<i>rli43</i>	1861533	1861377	<i>inlC</i>	<i>rplS</i>	2.190
<i>rli44</i>	2039087	2039375	<i>lmo1964</i>	<i>lmo1965</i>	2.154
<i>rli45</i>	2154765	2154852	<i>lmo2074</i>	<i>lmo2075</i>	2.440
<i>rli46</i>	2155058	2154765	<i>lmo2074</i>	<i>lmo2075</i>	2.440
<i>rli48</i>	2361405	2361274	<i>lmo2271</i>	<i>lmo2272</i>	2.571
<i>rli50</i>	2783264	2782981	<i>lmo2709</i>	<i>lmo2710</i>	3.483
<i>rli52</i>	552417	552313	<i>lmo0517</i>	<i>lmo0518</i>	2.423
<i>rli53</i>	955824	956021	<i>lmo0918</i>	<i>lmo0919</i>	2.358
<i>rli55</i>	1198108	1198561	<i>lmo1170</i>	<i>pduQ</i>	2.686
<i>rli56</i>	1199848	1199937	<i>pduQ</i>	<i>lmo1172</i>	2.624
<i>rli59</i>	1702543	1702361	<i>lmo1652</i>	<i>lmo1653</i>	2.464
<i>rli60</i>	2054162	2054501	<i>lmo1982</i>	<i>ilvD</i>	2.613
<i>rli61</i>	2275362	2275297	<i>lmo2187</i>	<i>lmo2188</i>	2.616
<i>rli78</i>	507068	507473	<i>lmo0470</i>	<i>lmo0471</i>	3.364
<i>rli94</i>	2039375	2039079	<i>lmo1964</i>	<i>lmo1965</i>	2.154
<i>rli98</i>	2361329	2361581	<i>lmo2271</i>	<i>lmo2272</i>	2.571
<i>rli112</i>	2782978	2783221	<i>lmo2709</i>	<i>lmo2710</i>	3.483

5.5. Real time PCR quantification of selected transcripts

In order to confirm the results of expression profiles, 10 target genes were selected for quantification by real time PCR. Four of these genes (*lmo0349*, *lmo0914*, *lmo0917* and *lmo2257*) were in the set of genes with higher transcript levels in the mutant background, 4 (*lmo0050*, *lmo0051*, *lmo0477* and *lmo2711*) had lower transcript levels in the Δ *agrA* mutant and 2 (*lmo0943* and *lmo2467*) had similar trends. qPCR analysis confirmed that all entries displayed similar patterns as observed with microarray results (Table 3).

6. Discussion

The genome of *L. monocytogenes* presents characteristics of ubiquitous organisms. Indeed, an extensive regulatory repertoire including 209 transcriptional regulators, 15 histidine kinases and 16 response regulators has been identified (Glaser *et al.*, 2001). In living organisms, regulons are interconnected in complex transcriptional regulatory circuitries (Chan *et al.*, 2008b, Oliver *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2013). Experimental evidence suggests that the AgrA regulon of *L. monocytogenes* regulates genes of transport and metabolism of amino acids and related molecules, genes of motility and chemotaxis, and also regulators (Garmyn *et al.*, 2012). These observations suggest that AgrA plays a role in the integration of environmental cues in order to adapt to stressful conditions (starvation, modification of temperatures...). In this study, we investigated whether AgrA, the response regulator of the Agr communication system, is important for *L. monocytogenes* to face the diverse and changing conditions encountered in the telluric environment. We developed soil microcosm survival experiments in order to study the survival patterns of the response regulator mutant (Δ *agrA*) carrying an in-frame deletion in *agrA*. Our results suggest that AgrA-mediated regulation is required for optimal soil adaptation of the pathogen as the Δ *agrA* mutant showed impaired abilities to survive in biotic soil microcosms. Survival dynamics differed according to the soil. In fact, in the 10 contrasted soils tested in this study, the final abundance of listerial populations varied from 1.5 to 4 log. This means that each soil, characterized by a combination of abiotic and biotic factors, has to be considered as a unique environment. Depending of the environmental factors, some soils are more detrimental to *L. monocytogenes* survival than others. In our study, pH is the predominant factor influencing *L. monocytogenes* dynamic in soils. These results are consistent with a previous study which showed that abiotic soil properties, in particular basic cation saturation ratio, pH and clay content of soils, influence survival of *L. monocytogenes* in soil (Locatelli *et al.*, 2013b). Interestingly, in growth-permissive sterilized soil microcosms, impairment of AgrA did not affect the ability

Table 3. Comparison of the fold change ($\Delta agrA$ mutant versus parental strain) of selected genes in the microarray and qPCR analyses.

Gene	Fold change	
	qPCR	Array
Up-regulated		
<i>lmo0349</i>	4.7	21.4
<i>lmo0914</i>	2.6	6.6
<i>lmo0917</i>	7.2	3.2
<i>lmo2257</i>	6.3	4.0
Down-regulated		
<i>lmo0050 (agrC)</i>	-8.2	-8.7
<i>lmo0051 (agrA)</i>	-6.7	-6.4
<i>lmo0477</i>	-37.9	-16.0
<i>lmo2711</i>	-7.2	-5.4
Unchanged		
<i>lmo0943</i>	1.4	1.6
<i>lmo2467</i>	1.2	1.1

of *L. monocytogenes* to colonize sterilized soil, indicating that the role of AgrA is not predominant under these environmental conditions. Moreover, the moderate variation of transcriptome between the parental and the $\Delta agrA$ mutant background is consistent with the phenotype. On the opposite, a strong variation of transcriptome was observed in biotic soil extracts. These results suggest that an extensive modification of gene expression is required for the adaptation of *L. monocytogenes* to soil. In this study, inactivation of AgrA altered transcription of genes related to cell envelope and cellular processes. It included PTS systems and ABC transporters dedicated to carbohydrates uptake. Up regulation of these genes in the parental background may illustrate metabolic adaptation required to use resources available in the soil environment where competition for substrates may occur (Marshall & Alexander, 1960, Hibbing *et al.*, 2010, Leigh *et al.*, 2011, van Elsas *et al.*, 2012). Indeed, prevalence of nutrient acquisition mechanisms in the onset of soil adaptation has been reported previously (Piveteau *et al.*, 2011). Similarly, modification of bacterial cell surface is required for environmental adaptation and during growth and survival in soil (van der Veen *et al.*, 2007, Hain *et al.*, 2008, Camejo *et al.*, 2009, Toledo-Arana *et al.*, 2009, Piveteau *et al.*, 2011). Inactivation of AgrA could have prevented appropriate adjustment of the cell surface to the conditions of the environment. Interestingly, genes known to code proteins involved in resistance to antimicrobial peptides were transcribed to lower levels in the mutant background. It may indicate that deletion of *agrA* impairs the onset of the appropriate mechanisms required to resist to competition by interference and to antimicrobial weaponry.

As represented in the heatmap (Figure 7), deletion of *agrA* affected the ability of *L. monocytogenes* to regulate transcription. As such, in the presence of soil microflora, the set of genes with higher transcript levels in the $\Delta agrA$ background probably results from the inability of the $\Delta agrA$ mutant to down regulate transcription of target genes. Similar observations were reported during incubation in the laboratory medium Tryptone Soya Broth at 25°C and 37°C (Garmyn *et al.*, 2012). At the *in vivo* temperature of 37°C, in the $\Delta agrA$ background, down regulation was suppressed for a set of genes coding proteins involved in cellular processes and metabolism.

Interestingly, transcript level of a large repertoire of ncRNA also varied under biotic conditions. ncRNAs have recently been identified as key regulators of several physiological processes and especially of virulence in bacteria. They regulate gene expression by affecting mRNAs stability or modifying proteins activity in response to environmental changes. Non coding RNAs (ncRNAs) act as key regulators in the regulation of gene expression. They have

been recognized as important regulators in biological processes in eukaryotes (Storz *et al.*, 2005) and bacteria (Gottesman, 2005, Repoila & Darfeuille, 2009). So far, a large repertoire of ncRNAs has been described in *L. monocytogenes* and evidence suggests that they are central in environmental adaptation (Christiansen *et al.*, 2006, Mandin *et al.*, 2007, Nielsen *et al.*, 2008, Toledo-Arana *et al.*, 2009, Mraheil *et al.*, 2011, Nielsen *et al.*, 2011, Mellin & Cossart, 2012, Wurtzel *et al.*, 2012). As in other bacterial models, this non-coding part of the genome has been recognized as an important contributor to the regulation of virulence in *L. monocytogenes* (Mandin *et al.*, 2007, Loh *et al.*, 2009, Toledo-Arana *et al.*, 2009, Mraheil *et al.*, 2011, Mellin & Cossart, 2012). ncRNA may participate to the transition of saprophyte to intracellular life. For example, *rli38* (a ncRNA regulated in blood and absent in *L. innocua*) forms a complex with three transcripts of genes coding proteins implicated in *L. monocytogenes* adaptation to blood (Toledo-Arana *et al.*, 2009) and *rli28*, *rli32*, *rli34*, *rli38*, *rli49* and *rli50* pair to mRNA of genes of which products are implicated in the virulence of the pathogen, as internalins (Toledo-Arana *et al.*, 2009). Beyond virulence, studies also state that ncRNA participate to the regulation of metabolism and transport of sugars (Mandin *et al.*, 2007, Nielsen *et al.*, 2011), synthesis of vitamins (Mellin & Cossart, 2012) and motility (Mellin & Cossart, 2012). In addition, ncRNA are included in a more complex transcriptional regulatory circuitry. Indeed, deletion of the ncRNA *lhrA* affects the expression of more than 300 genes (Nielsen *et al.*, 2011) and several ncRNA are preceded by a σ A, σ B or PrfA box, suggesting a potential regulation of the ncRNA by these proteins (Oliver *et al.*, 2009, Mellin & Cossart, 2012). In accordance of these studies, our results suggest that the regulator AgrA also participates to the regulation of the RNome.

Altogether these results give more insight on the role of the response regulator AgrA and the Agr communication system for *L. monocytogenes* adaptation. The Agr communication system, through the response regulator AgrA, seems to be essential for the pathogen to remain in the soil environment. Interestingly, in soil, AgrA-mediated regulation comes in response to biotic parameters, either directly or indirectly. These results highlight that soil adaptation of *L. monocytogenes* requires reshaping of gene expression at the transcriptional level. Finally, our data suggest that the regulator AgrA may have a central role in the transcriptional regulatory circuitry and participate to the modulation of a large repertoire of ncRNAs.

7. Bilan

Les résultats présentés dans cet article suggèrent que le régulateur AgrA est nécessaire pour l'adaptation optimale de *L. monocytogenes* dans le sol. Une réduction de la survie du mutant $\Delta agrA$ a en effet été observée dans les microcosmes de sol en condition biotique. De façon intéressante, dans les microcosmes de sol stérilisé, le mutant semble être tout aussi qualifié que la souche parentale pour coloniser cet environnement, indiquant que le rôle du régulateur AgrA n'est pas prédominant pour l'adaptation de *L. monocytogenes* en absence de pression biotique, lorsque les conditions environnementales sont plus favorables à la croissance de la bactérie. L'analyse des profils transcriptomiques apporte des informations complémentaires. L'analyse différentielle montre en effet de faibles variations de l'expression des gènes entre les deux souches étudiées lorsque celles-ci sont cultivées dans l'extrait de sol stérilisé alors que d'importantes variations ont été observées après leur introduction dans l'extrait de sol en condition biotique. Cette analyse suggère que l'expression des gènes est fortement influencée par l'environnement biotique de la bactérie et que la régulation transcriptionnelle liée à AgrA est nécessaire pour sa survie dans le sol. Le taux de transcrit des gènes impliqués dans les processus cellulaire varie dans les conditions biotiques. Une part significative du transcriptome a notamment été allouée aux systèmes PTS et aux transporteurs ABC nécessaires pour l'assimilation des sources carbonnées disponibles dans le sol.

De plus, le taux de transcrits d'un large répertoire d'ARNnc a également été identifié comme significativement différent entre la souche parentale et le mutant dans l'extrait de sol biotique. Ceci pourrait indiquer que le régulateur AgrA est impliqué, de façon directe ou indirecte, dans la régulation d'ARNnc.

Cette étude donne un aperçu du rôle du régulateur AgrA et du système Agr dans l'adaptation de *L. monocytogenes* au sol. Le système Agr, par l'intermédiaire du régulateur AgrA, assure la survie du pathogène dans le sol. Les résultats mettent en avant que l'adaptation de *L. monocytogenes* dans cet environnement s'accompagne d'une forte réorganisation transcriptionnelle. Enfin, les données suggèrent que le régulateur AgrA pourrait avoir un rôle central dans le réseau de régulation transcriptionnelle et participer à la modulation de la transcription d'un large répertoire d'ARNnc.

Chapitre 3

L'activité du système Agr apporte un bénéfice aux populations de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Anne-Laure Vivant, Dominique Garmyn, Laurent Gal et Pascal Piveteau. (soumis, ISME).

The Agr communication system provides a benefit to the populations of *L. monocytogenes* in soil.

1. Avant-propos

Nous avons montré dans le chapitre précédent que l'activité du régulateur transcriptionnel AgrA participe à la survie de *L. monocytogenes* dans le sol. Dans ce second chapitre de résultats, nous avons cherché à déterminer d'une part si l'autoinduction du système Agr était impliquée dans la meilleure survie observée pour la souche parentale, et d'autre part si un système Agr fonctionnel favorisait la compétitivité dans le sol par rapport aux souches mutantes au système Agr non fonctionnel ou, en d'autres termes, si les cellules qui expriment le système Agr possèdent un avantage par rapport aux cellules qui ne l'expriment pas. Dans une perspective de sociomicrobiologie, sont abordés le rôle du système Agr dans le sol. Les bactéries utilisent les systèmes de communication pour réguler la production de facteurs extracellulaires pouvant être utilisés par l'ensemble des individus (« biens publics ») et/ou des enzymes qui ne sont pas partagés par les individus (« biens privés »). Chez *L. monocytogenes*, aucune étude ne s'est intéressée au système de communication Agr comme trait social des populations de *L. monocytogenes*. Dans le sol, le système Agr pourrait aussi bien réguler des biens publics que des biens privés. De plus, savoir si le système Agr est actif dans le sol est une question ouverte.

Dans ce contexte, nous avons cherché à étudier la compétitivité de souches mutantes dont le système Agr est altéré et de la souche parentale. Pour cela, des co-cultures ont été réalisées dans des microcosmes de sol stérilisé ou non. Deux mutants ont été utilisés dans cette étude. Un mutant « signal-négatif » ($\Delta agrD$) qui ne produit pas le propeptide AgrD mais qui peut potentiellement répondre aux molécules signal, et un mutant « AgrA-non fonctionnel » ($\Delta agrA$) dont le système Agr est non fonctionnel et pour lequel aucune réponse aux molécules signal n'est possible et donc pour lequel aucune production de signal n'est attendue.

Chapitre 3. L'activité du système Agr apporte un bénéfice aux populations de *Listeria monocytogenes* dans le sol

The Agr communication system provides a benefit to the populations of *Listeria monocytogenes* in soil

Anne-Laure Vivant^{1,2}, Dominique Garmyn^{1,2}, Laurent Gal^{2,3} and Pascal Piveteau^{1,2*}

¹Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

²INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

³ AgroSup Dijon, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

*Corresponding author. INRA, UMR1347 Agroécologie, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France.

E-mail: piveteau@u-bourgogne.fr

Running title: Agr system and *L. monocytogenes* behaviours in soil

2. Abstract

In this study, we investigated whether the Agr communication system of the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* was involved in adaptation and competitiveness in soil. Alteration of the ability to communicate, either by deletion of the gene coding the response regulator AgrA (response-negative mutant) or the signal pro-peptide AgrD (signal-negative mutant), did not affect population dynamics in soil that had been sterilised but survival was altered in biotic soil suggesting that the Agr system of *L. monocytogenes* was involved to face the complex soil biotic environment. This was confirmed by a set of co-incubation experiments. The fitness of the response-negative mutant was lower either in the presence or absence of the parental strain but the fitness of the signal-negative mutant depended on the strain with which it was co-incubated. The survival of the signal-negative mutant was higher when co-cultured with the parental strain than when co-cultured with the response-negative mutant. These results showed that the ability to respond to Agr communication provided a benefit to listerial cells to compete. These results might also indicate that in soil, the Agr system controls private goods rather than public goods.

3. Introduction

For the last few decades, communication between bacteria has raised a growing interest. Cell-to-cell communication is based on the synthesis, the diffusion between cells and the perception of signal molecules. The perception of these molecules in the cell's extracellular environment induces the regulation of transcription and eventually adjustment of the physiology of the cell to its surrounding environmental conditions. Various communication systems have been described in the prokaryotic world. They differ according to the type of signal molecules and the machinery used to integrate the signal. To date, the communication systems most studied involve cyclic peptides (AIP), acyl-homoserine lactones (acyl-HSL) or auto-inducer-2 (AI-2) as signal molecules (Miller & Bassler, 2001, Reading & Sperandio, 2006, Atkinson & Williams, 2009).

Several social traits are regulated through cell-to-cell communication. Adhesion, biofilm formation and mobility require functional communication systems in several bacterial species (Labbate *et al.*, 2004, Yarwood *et al.*, 2004, Sturme *et al.*, 2005, Rieu *et al.*, 2007, Boles & Horswill, 2008, Fujii *et al.*, 2008, Jayaraman & Wood, 2008, Riedel *et al.*, 2009, Ray & Visick, 2012, Bowden *et al.*, 2013). Public goods are exo-products as for example, virulence factors, surfactants or antibiotics produced and secreted by bacterial populations.

Their production is usually under the control of the spatial distribution and density of cells and is dependent on the characteristics of mass transfer in the environment. For example, in *Staphylococcus aureus* (Morfeldt *et al.*, 1995, Novick & Geisinger, 2008), *Enterococcus faecalis* (Qin *et al.*, 2001, Nakayama *et al.*, 2006), *Clostridium perfringens* (Vidal *et al.*, 2011, Chen & McClane, 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Passador *et al.*, 1993, Pearson *et al.*, 1997) and *Listeria monocytogenes* (Autret *et al.*, 2003, Riedel *et al.*, 2009), communication systems control the secretion of the virulence factors required for the onset of infection. Moreover, survival mechanisms, such as sporulation, granule formation and antibiotic production are also controlled by communication systems in *Clostridium acetobutylicum* (Steiner *et al.*, 2012), *Pseudomonas chlororaphis* (Morohoshi *et al.*, 2013) and *Bacillus subtilis* (Comella & Grossman, 2005). These communication-dependent coordinated behaviours are examples of cooperation in the microbial world (Keller & Surette, 2006, Diggle *et al.*, 2007b). Such a social trait is vulnerable to exploitation by cheaters, these individuals that do not cooperate but gain the benefit from others cooperating (Velicer, 2003). Cheaters are individuals unable either to respond to the signal or to synthesize it. Cheaters have been isolated from populations of clinical and environmental *P. aeruginosa* (Salunkhe *et al.*, 2005, Heurlier *et al.*, 2006). Saving the cost of the production of the signal molecules, of their detection or production of exo-products (Diggle *et al.*, 2007b) may give cheaters an advantage and may decrease the value of cooperation (West *et al.*, 2002, Rainey & Rainey, 2003). Experimentally, under controlled environments where access to public goods is required for growth, cheaters are fitter than individuals that cooperate (Rainey & Rainey, 2003, Diggle *et al.*, 2007b). Assessing the value of cooperation in natural settings is required in order to understand why communication and cooperation behaviours have been conserved so far in bacteria.

We tackled this issue with the bacterial model *Listeria monocytogenes* as this food-borne pathogen is ubiquitous in nature. It has been isolated from water systems (De Luca *et al.*, 1998, Paillard *et al.*, 2005, Lyautey *et al.*, 2007b), vegetation (Welshimer, 1968, Beuchat, 1996), farms (Nightingale *et al.*, 2004, Fox *et al.*, 2009, Latorre *et al.*, 2010, Strawn *et al.*, 2013), food industries (Goulet *et al.*, 1998, Garrido *et al.*, 2009, Serio *et al.*, 2011) and faeces of animals (Fenlon, 1985, Iida *et al.*, 1991). It is also found in soil (Welshimer, 1960, Weis & Seeliger, 1975, Locatelli *et al.*, 2013a, Vivant *et al.*, 2013b). A communication system has been characterised in this organism. It is the Agr system that regulates adhesion, biofilm formation (Rieu *et al.*, 2007, Riedel *et al.*, 2009) and infection of mammalian hosts (Autret *et*

al., 2003, Riedel *et al.*, 2009). Four genes, *agrBDCA*, code the proteins required for Agr communication (Autret *et al.*, 2003, Garmyn *et al.*, 2009). Among them, *agrD* codes the propeptide AgrD processed into a mature autoinducing peptide (AIP) by AgrB; AgrA, the transcriptional regulator of the two component system AgrC/AgrA, is the response component of the system. Detection of AIP by the sensor AgrC triggers activation of AgrA. In order to investigate whether or not cooperation through communication provided an advantage to populations of *Listeria monocytogenes* in complex, natural environments, we compared the behaviour of two communication mutants, a signal-negative mutant $\Delta agrD$ unable to produce AIP but equipped to sense and respond to AIP, and a response-negative mutant $\Delta agrA$ unable to respond to extracellular signal, to the behaviour of the parental strain following inoculation in soil.

4. Materials and methods

4.1. Bacterial strains and culture media

Rifampicin resistant mutants of the parental strain *L. monocytogenes* EGD-e, the $\Delta agrA$ in frame deletion mutant DG125A and the $\Delta agrD$ in frame deletion mutant DG119D (Rieu *et al.*, 2007), respectively *L. monocytogenes* L9 (Lemunier *et al.*, 2005), *L. monocytogenes* DG125A6 and *L. monocytogenes* DG119D9 (this study) were used. For each strain, spontaneous Rif^R mutants were selected by comparing growth rates during planktonic growth and the ability to grow as biofilm in trypton soy broth (TSB; AES chemunex, Bruz, France) at 25°C without shaking. *L. monocytogenes* DG125A6 was used as a response-negative mutant and *L. monocytogenes* DG119D9 as a signal-negative mutant.

A working stock stored at -80°C was used throughout the study. Strains were grown statically at 25°C for 16h in 5ml of TSB. Three independent inocula were prepared by inoculating 10 ml of TSB to reach an O.D_{600nm} of 0.04 and incubating statically at 25°C to an O.D_{600nm} of 0.4. The cultures were then centrifuged at 8000 g for 5 minutes at room temperature and pellets were suspended in NaCl (0.85%). Cultures were adjusted to a concentration of 2.10⁸ CFU/ml.

4.2. Soil samples and soil microcosms preparation

Soil was sampled in a pasture located in Burgundy, France. This sampling site belongs to a country-wide soil sampling network (RMQS) based on a 16 x 16 km systematic grid covering the whole of France (Arrouays *et al.*, 2002). Twenty-five individual core samples of

topsoil (0–30 cm) were taken using a sampling design within an area of 20 x 20 m. The core samples were then mixed to obtain a composite sample. The soil sample was then sieved to 5 mm and stored at 4°C. Aliquots of the soil were heat sterilized three times (120°C, 20 min) with a period of 24 hours between each autoclave treatment. Fifty g of sterilised and non sterilised soil were packed in triplicate to constitute sterilised and biotic soil microcosms. Soil's attributes such as location, composition, chemistry and land use are stored in the DONESOL database (Grolleau *et al.*, 2004). Briefly, it is a clay soil with neutral pH. Organic carbon and nitrogen content were respectively 35.3 and 3.9 g.kg⁻¹.

4.3. Soil microcosm inoculation with single strain and co-inoculation

Single strain cultivation in biotic and sterilized soil were performed by inoculating a single strain, either *L. monocytogenes* L9, *L. monocytogenes* DG125A6 or *L. monocytogenes* DG119D9, at a concentration of 2.10⁶ CFU/g in 50 g soil microcosms. Microcosms were also co-inoculated with appropriate mixtures from individual cultures to a final ratio of 50:50 (2.10⁶:2.10⁶ CFU/g). The following listerial mixtures were tested: *L. monocytogenes* L9 / *L. monocytogenes* DG125A6, *L. monocytogenes* L9 / *L. monocytogenes* DG119D9, and, *L. monocytogenes* DG125A6 / *L. monocytogenes* DG119D9. Experiments were prepared in triplicates. All inoculated and co-inoculated microcosms were incubated at 25°C in the dark.

4.4. Enumeration and determination of listerial populations dynamics

For single-cultures, listerial populations were enumerated by serial plating on Polymyxin-Acriflavin-Lithium-Chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol agar (PALCAM; AES Chemunex, Bruz, France) supplemented with 100 µg.l⁻¹ cycloheximide and 100 µg.l⁻¹ rifampicin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) immediately after inoculation and periodically over a 14-days period for microcosms or over a 48-hours period for extracts.

In microcosms inoculated with 50/50 mixtures, the total number of listerial cells was enumerated as described above. The proportion of each of the two strains was determined by specific PCR amplification (described below) from up to 96 colonies collected from the supplemented PALCAM plates.

4.5. PCR amplification

DNA template was prepared by transferring each colony in 200 µl of water. Three sets of specific primers were designed to determine the genotype. The sequences and the genotype targeted are shown in Table S1. PCR amplification was carried out in a final volume of 20 µl containing 2.5 µl of DNA template, 1 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint

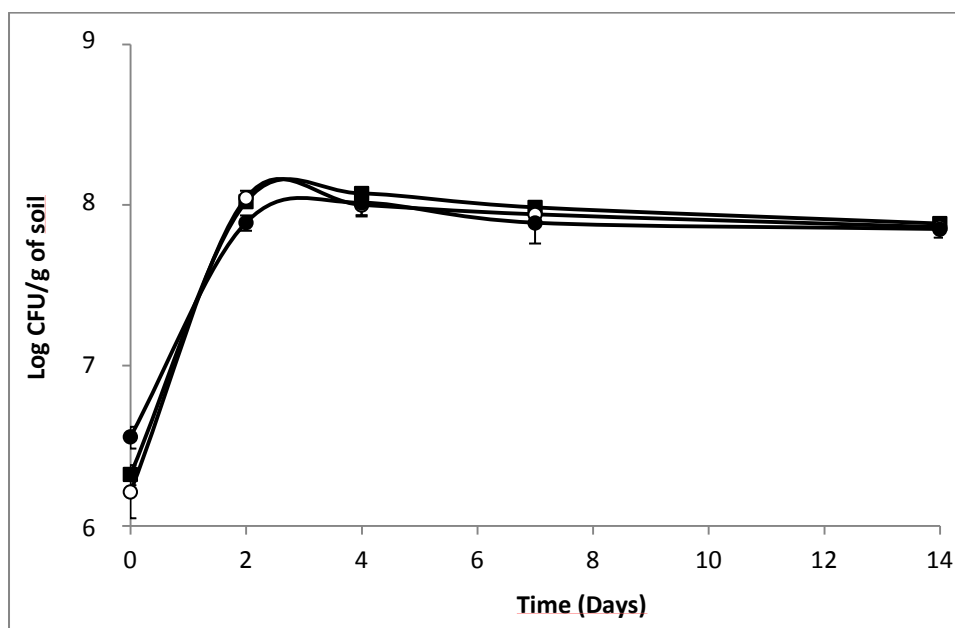


Figure 1. Growth kinetics of *L. monocytogenes* parental strain (■), signal- negative (○) and response-negative (●) mutants in sterilized soil microcosms. The errors bars represent standard deviation from three replicate samples value.

Quentin Fallavier, France), 2 µl of 10X PCR buffer with MgCl₂, 0.16 µl of dNTP mix (25 mM), 1.0 U of Taq polymerase (MP Bio, Illkirch Graffenstaden, France), and a final concentration of 0.6 µM of each primer. The following conditions were specifically determined and used: 95°C for 10 minutes, 30 cycles of 15 seconds at 95°C, 50°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, followed by 7 minutes at 72°C.

4.6. Competitive index determination

The competitive index (CI) was calculated as follows:

$$CI_{tx} = ((CFU_{mutant}/CFU_{parental})_{tx})/((CFU_{mutant}/CFU_{parental})_{t0})$$

where CI_{tx} is the competitive index at time tx (x= 2 days, 4 days, 7 days or 14 days), CFU_{mutant} and $CFU_{parental}$ are the number of Colony Forming Units per gram of soil of the mutant and the parental strains respectively, at time tx and at time t0. A CI score of 1 indicates no fitness difference.

4.7. Statistical analysis

In order to compare survival patterns of listerial populations in both sterilized and biotic microcosms and to estimate whether or not the CI evolved over time, thus to determine whether a strain had a better ability to compete in soil, the repeated-measures analysis of variance (repeated-measures ANOVA) was performed.

5. Results and Discussion

5.1. Dynamics of listerial populations in soil microcosms

In sterilized soil microcosms, the population of the parental strain *L. monocytogenes* L9 increased of over 2 log within the first two days of incubation and the population remained stable until the end of the experiment (Figure 1). Inactivation of the Agr system did not affect the dynamics of the mutants' population and no significant differences were observed between growth profiles of the parental strain, the signal-negative $\Delta agrD$ mutant and the response-negative $\Delta agrA$ mutant. Similar results were collected during growth in sterilized soil extracts (data not shown). These results confirm previous reports on the ability of *L. monocytogenes* to multiply in sterilized soil (Dowe *et al.*, 1997, Moshtaghi *et al.*, 2009, McLaughlin *et al.*, 2011, Piveteau *et al.*, 2011). Moreover, our results suggest that the ability to produce AIP and to respond to the signal is not indispensable for growth of *L. monocytogenes* in this specific environment.

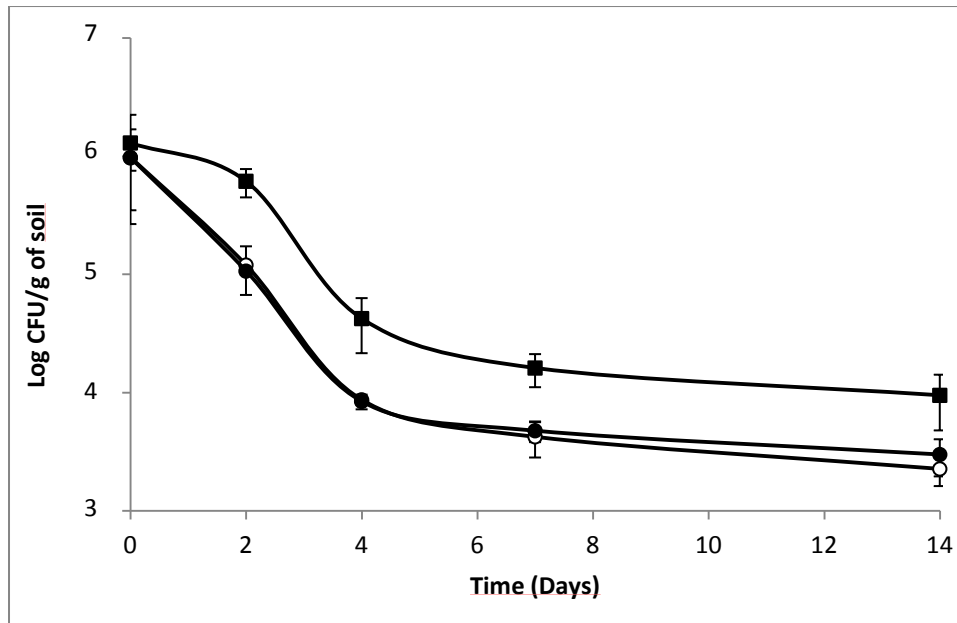


Figure 2. *L. monocytogenes* parental strain (■), signal- negative (○) and response-negative (●) mutants survival in biotic soil microcosms. The errors bars represent standard deviation from three replicate samples value.

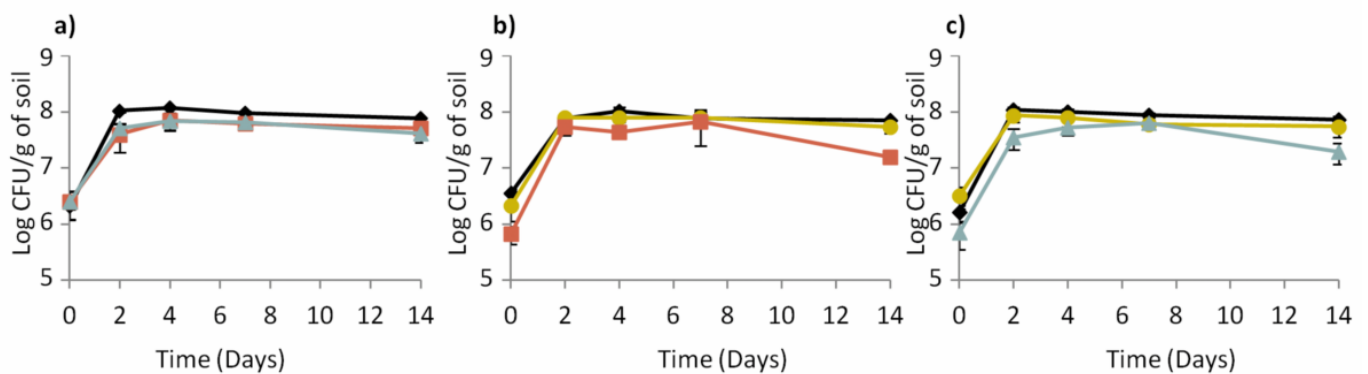


Figure 3. Dynamics of (a) the parental strain, (b) the response-negative mutant and (c) the signal-negative mutant populations in sterilised soil microcosms. (◆) Single culture, (●) co-culture with the parental strain, (▲) co-culture with the response-negative mutant, (■) co-culture with the signal-negative mutant. Error bars represent the standard deviation from three replicate samples value.

When indigenous microflora was not inactivated, in biotic soil microcosms, results were different (Figure 2). First of all, no growth was observed. The population of the parental strain was stable during the first two days of incubation thereafter the population declined throughout the duration of the experiment. Furthermore, the behaviour of the mutants was significantly different. Indeed, the population of the two mutants declined sharply within the first two days of incubation and it was over one log lower than that of the parental strain from day 2 to the end of the experiment ($P < 0.05$). Differences between mutants were not significant. The results point out to the role of endogenous microbial communities in limiting implantation of *L. monocytogenes* in soil. Indeed, inactivation of telluric communities lifts inhibition (Dowe *et al.*, 1997, Locatelli *et al.*, 2013b, Vivant *et al.*, 2013c). Moreover, microbial diversity is critical regarding the ability of soil microbial communities to limit invasion by *L. monocytogenes* (Vivant *et al.*, 2013). Our data strongly suggest that the activity of the Agr communication system is required for optimal survival of *L. monocytogenes* in soil. This suggests that the production of signal molecules and/or AgrA-mediated regulation improves the fitness of the populations of *L. monocytogenes* in soil. Moreover, production of private or public goods could be involved. In order to figure out if signal sensing in one hand or public goods production in the other hand underpinned the fitness advantage of the parental strain, we followed the fate of populations of the signal-negative and response-negative mutants during co-incubation with the parental strain in soil microcosms.

5.2. Comparison of the fitness of the mutants and parental strains in soil microcosms

To determine if alteration of the Agr communication system affected fitness in soil, we measured the survival of the parental strain and of both mutants in sterilised or biotic soil depending on whether they had been cultured with the parental strain, a mutant or as single listerial population. Moreover, Competitive Indexes (CI) of co-cultured listerial strains over a 14-days period in soil microcosms were calculated.

As shown in Figure 3, in sterilized soil microcosms, colonisation profiles were similar for all strains whether they had been cultured as a single strain or with a partner. Moreover, variations of the CI were not significant (ANOVA, $P > 0.05$) (Table 1). This is consistent with the results described above and confirms that in sterilized soil, in the absence of biotic pressure, inactivation of the Agr system does not alter the competitiveness of the mutants. Considering that in sterilized soil, cell density is higher than in biotic soil (about 4 log) and that scavenging of signal molecules is more limited, accumulation of signal molecules is

Table 1. Competitive Indexes of co-cultured listerial strains over a 14-days period in sterilised soil microcosms.

Time (Days)	Response-negative mutant/parental strain	Signal-negative mutant/parental strain	Response-negative mutant/signal-negative mutant
0	1	1	1
2	1.91	3.21	3.74
4	1.50	1.37	1.03
7	1.81	1.13	1.63
14	1.67	1.68	1.12

* indicates when the CI significantly differed from the time 0 (repeated-measures ANOVA, Tukey, $P < 0.05$).

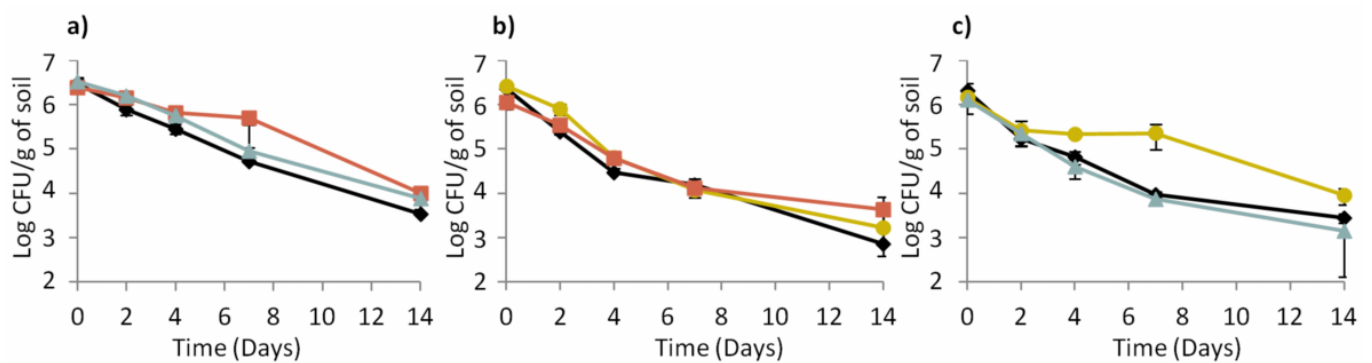


Figure 4. Dynamics of (a) the parental strain, (b) the response-negative mutant and (c) the signal-negative mutant populations in biotic soil microcosms. (♦) Single culture, (●) co-culture with the parental strain, (▲) co-culture with the response-negative mutant, (■) co-culture with the signal-negative mutant. Error bars represent the standard deviation from three replicate samples value.

Table 2. Competitive Indexes of co-cultured listerial strains over a 14-days period in biotic soil microcosms.

Time (Days)	Response-negative mutant/parental strain	Signal-negative mutant/parental strain	Response-negative mutant/signal-negative mutant
0	1	1	1
2	0.54	0.31*	0.80
4	0.20*	0.31	0.50
7	0.25*	1.26	0.49
14	0.26*	1.74	1.95

* indicates when the CI significantly differed from the time 0 (repeated-measures ANOVA, Tukey, $P < 0.05$).

expected. This suggests that, under these experimental conditions, the AgrA-controlled features may not be essential for growth.

Under biotic conditions, survival of the parental strain (Figure 4a) and the response-negative mutant (Figure 4b) did not vary whatever the co-culture tested. On the opposite, results indicated a significant (ANOVA, $P < 0.05$) improvement of the signal-negative mutant's survival when co-cultured with the parental strain but not when co-cultured with the response-negative mutant (Figure 4c). This indicates that the fitness of the signal-mute strain depended of the presence or absence of cells with active Agr systems and that the parental strain provided a benefit to this mutant. In addition to this, CI measurements showed that under biotic conditions, the CI of the response-negative mutant co-incubated with the parental strain significantly (ANOVA, $P < 0.05$) decreased over time (Table 2). Under these conditions, the parental strain had a significant competitive advantage over the response-negative mutant. The inability to respond to Agr communication was detrimental to the survival of the response-negative mutant. This is supporting the idea that the Agr communication system is important for competitiveness of *L. monocytogenes* in soil when complex microbial communities are active. When the signal-negative mutant and the parental strain were co-inoculated, the analysis of variance showed that the CI did not significantly vary over the 14 days of the experiment except after 2 days of incubation where the CI of the signal-negative mutant was significantly lower than the parental strain ($P < 0.05$) (Table 2). These results suggest that, at later stages of incubation, the fitness of the signal-negative mutant was similar to the fitness of the parental strain during co-culture, confirming that the presence of the parental strain improved competitiveness of the signal-negative mutant. Finally, when the two mutants were tested in biotic soil microcosms, the CI did not vary significantly over time (Table 2) meaning that none of the mutants took advantage over the other during the 14 days of incubation.

These results show first of all that signal molecules accumulate to levels sufficient to promote induction of the Agr communication system. The minimal threshold required to induce communication and cell-density-dependent gene expression depends on properties of the environment such as water availability, mass-transfer (Dulla & Lindow, 2008) and cell distribution (Hense *et al.*, 2007). Under specific environmental conditions, with restricted diffusion of signal molecules, quorum can be reached even in small size populations. For example, on the surface of leaves, as few as ten aggregated cells of *Pseudomonas syringae* can reach the quorum size (Dulla & Lindow, 2008). The local characteristics of soil such as

the rates of diffusion and degradation of signal molecules and the cell density could generate a social environment propitious to communication between cells of *Listeria monocytogenes* even if present in small size populations.

Secondly, these results suggest that cells of the signal-mute population perceive and integrate signals produced by the parental strain into a concerted Agr response that restored the fitness of the signal-mute mutant. Such improvement was not observed with the response-negative mutant suggesting that under these experimental conditions, the Agr communication system regulates intracellular factors (private goods) rather than exo-products (public goods). Production of private goods promotes fitness advantage at the level of the individual cell in the bacterial models *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* (Dandekar *et al.*, 2012, Darch *et al.*, 2012, Oslizlo *et al.*, 2014). Control of private goods by the Agr communication system is supported by results of transcriptomic analyses. Indeed, gene expression profile of the response-negative $\Delta agrA$ mutant indicated that deletion of *agrA* resulted in deregulations of amino acids, purine and pyrimidine synthesis pathways and nitrogen transport (Garmyn *et al.*, 2012). In soil, adaptation of *L. monocytogenes* requires an extensive reprofiling of gene expression (Piveteau *et al.*, 2011) and genes coding proteins involved in cellular processes (transport proteins) and intermediary metabolism (specific pathways for metabolism of carbohydrates) including chitinases and β -glucosidases are upregulated. In the telluric environment where nutrients can be scarce, bacteria must be able to use a large range of carbon and nitrogen sources, for example cellulose and by-products of its hydrolysis (vegetal residues) and chitin (arthropod exoskeleton and cell wall of fungi) polymers largely represented in nature, and to synthesize specific enzymes for their catabolism. The ability of *L. monocytogenes* to acquire and use these energy sources could be critical for its saprophytic life in soil.

Recently, chitin hydrolysis by *L. monocytogenes* was reported to be under the control of the Agr System (Paspaliari *et al.*, 2014). In our experiment, although chitin hydrolysis could generate public goods, we did not evidence any detrimental effect of the presence of mutants to the fitness of the parental strain. Agr mutants did not seem to act as cheaters exploiting the benefit of cooperation under our experimental conditions. In soil, cellular density may be locally inappropriate to gain benefit of cooperation. Others have shown that induction of private goods can be dominant and mask the benefits of public goods (Dandekar *et al.*, 2012). Considering social traits are vulnerable to cheaters, in populations of *L. monocytogenes*, Agr mutants should be isolated from environments where Agr

communication mediates social traits. However, at the moment, no environmental or clinical isolates of *L. monocytogenes* has been reported with mutations in *agrBDCA*. On the opposite, *P. aeruginosa* cheaters have been isolated from specific, confined environments where diffusion of signal molecules is low and where the pathogen is able to settle for a long period (Sandoz *et al.*, 2007). Characteristics of the various environments where most isolates of *L. monocytogenes* have been collected so far are not propitious to the emergence of cheaters.

6. Conclusion

The results reported here give new insights into the role of the Agr communication system in complex natural settings. First of all, the Agr communication system is required for optimal survival of *L. monocytogenes* in soil; secondly, it provides a benefit to *L. monocytogenes* populations in soil; thirdly, in the natural environment, production of signal molecules triggers a response in the receiving cells; and fourthly, the Agr system controls private goods. The question of whether the Agr system is a social trait of listerial populations remains to be investigated further. Indeed, the fact that the Agr system controls private goods does not exclude that it also controls public goods in specific habitats of *L. monocytogenes*.

7. Bilan

Dans les microcosmes de sol stérilisé, la compétitivité des souches ne varie pas significativement, indiquant que les mutations dans le système Agr n'altèrent pas la compétitivité des mutants lorsque la pression biotique est levée.

Dans les microcosmes de sol en condition biotique, la compétitivité des deux mutants en co-culture est similaire. La co-culture avec la souche parentale montre que le mutant « AgrA-non fonctionnel » est moins compétitif tout au long de l'incubation dans le sol biotique. Dans cette condition, la non fonctionnalité du système Agr affecte la survie de *L. monocytogenes* et la population du mutant est inférieure d'un log. Le comportement du mutant « signal-négatif » en co-culture avec la souche parentale est différent. En effet sa compétitivité vis-à-vis de la souche parentale est significativement plus faible lors des deux premiers jours d'incubation mais par la suite redevient similaire à celle de la souche parentale jusqu'à la fin de la période d'incubation. La différence majeure entre les deux mutants est que le mutant « signal-négatif » ne produit pas de molécules signal mais est équipé pour les détecter et y répondre alors que le mutant « AgrA-non fonctionnel » est incapable de répondre même en présence de molécules signal. Les résultats complexes obtenus avec le mutant « signal-négatif » pourraient ainsi s'expliquer par la détection des molécules signal produites par la souche parentale, et par l'induction de la réponse associée. Ainsi, la survie dans le sol nécessiterait l'émission et la réception de molécules signal.

De plus, ces résultats montrent que dans les conditions testés, le système Agr est actif, indiquant que l'accumulation des molécules signal est possible. Ces résultats indiquent également que le système Agr exerce un contrôle intrinsèque de la cellule (contrôle de bien privées) et non le contrôle des gènes codant des biens publics. Si tel était le cas, le mutant $\Delta agrA$ aurait été favorisé par la co-culture avec la souche parentale, de la même façon que le mutant $\Delta agrD$.

Les résultats présentés dans ce chapitre mettent en avant que : (i) le système de communication Agr participe à la survie et la compétitivité des populations de *L. monocytogenes* dans le sol, (ii) la compétitivité des souches mutantes et de la souche parentale diffèrent suivant les co-cultures testées, et (iii) le mutant « signal-négatif » pourrait être considéré comme un mutant tricheur. Cette étude a permis d'appréhender le trait social du système de communication Agr de *L. monocytogenes* et d'évaluer son bénéfice pour la survie de *L. monocytogenes* dans le sol.

Chapitre 4

La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Vivant, A.L., Garmyn, D., Maron, P.A., Nowak, V., Piveteau, P. (2013). Microbial diversity and structure are drivers of the biological barrier effect against *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS ONE* **8**: e76991. doi:76910.71371/journal.pone.0076991.

1. Avant propos

L'étude bibliographique présentée dans le chapitre 1, a permis de réaliser une synthèse des principales informations relatives à l'écologie de *L. monocytogenes* dans le sol. Comprendre l'écologie des microorganismes pathogènes est essentiel pour contrôler leur dissémination dans l'environnement. Les données bibliographiques montrent que les paramètres physico-chimiques du sol tels que la texture, le pH, le taux d'humidité ou la température impactent le devenir des populations de *L. monocytogenes*. Au même titre, la composante biotique tellurique semble jouer un rôle sur la survie du pathogène. La dynamique des populations de *L. monocytogenes* varie en effet selon que le sol ait été stérilisé ou non. Néanmoins, ces études basées sur l'absence ou la présence de la fraction biotique se limitent à tester l'effet de l'abondance globale des microorganismes du sol mais n'apportent pas de données sur le rôle de la diversité et de la structure des communautés microbiennes dans le devenir de *L. monocytogenes* dans le sol.

Parmi les principes de l'écologie, les travaux d'Elton réalisés dans les années 50 proposent que la diversité des communautés animales et végétales agit comme une barrière biologique et diminue le risque d'invasion d'une espèce étrangère à la communauté. Les études faisant état d'un rôle de la diversité microbiennes du sol contre l'invasion de microorganismes, et notamment de pathogènes tels que *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, restent limitées et ces études se limitent à une caractérisation partielle de la diversité des communautés microbiennes du sol.

Ainsi, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de la diversité microbienne contre l'invasion de *L. monocytogenes* dans le sol. La démarche choisie pour cette étude est une approche de dilution jusqu'à extinction. Cette approche permet d'éroder artificiellement les communautés microbiennes, permettant la construction de microcosmes de sol aux communautés de diversité et de compositions différentes, mais d'abondance similaire. Des profils de survie des populations de *L. monocytogenes* inoculées dans les microcosmes construits ont ensuite été établis et comparés aux profils taxonomiques déterminés par pyroséquençage.

Microbial Diversity and Structure Are Drivers of the Biological Barrier Effect against *Listeria monocytogenes* in Soil

Anne-Laure Vivant^{1,2}, Dominique Garmyn^{1,2}, Pierre-Alain Maron^{2,3}, Virginie Nowak^{2,3}, Pascal Piveteau^{1,2*}

1 Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France, 2 INRA, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France, 3 Plateforme GenoSol, INRA, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France

Abstract

Understanding the ecology of pathogenic organisms is important in order to monitor their transmission in the environment and the related health hazards. We investigated the relationship between soil microbial diversity and the barrier effect against *Listeria monocytogenes* invasion. By using a dilution-to-extinction approach, we analysed the consequence of eroding microbial diversity on *L. monocytogenes* population dynamics under standardised conditions of abiotic parameters and microbial abundance in soil microcosms. We demonstrated that highly diverse soil microbial communities act as a biological barrier against *L. monocytogenes* invasion and that phylogenetic composition of the community also has to be considered. This suggests that erosion of diversity may have damaging effects regarding circulation of pathogenic microorganisms in the environment.

Citation: Vivant A-L, Garmyn D, Maron P-A, Nowak V, Piveteau P (2013) Microbial Diversity and Structure Are Drivers of the Biological Barrier Effect against *Listeria monocytogenes* in Soil. PLoS ONE 8(10): e76991. doi:10.1371/journal.pone.0076991

Editor: Ching-Hong Yang, University of Wisconsin-Milwaukee, United States of America

Received: July 15, 2013; **Accepted:** September 4, 2013; **Published:** October 8, 2013

Copyright: © 2013 Vivant et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work, through the involvement of technical facilities of the GenoSol platform of the infrastructure ANAEE-Services, received a grant from the French state through the National Agency for Research under the program "Investments for the Future" (reference ANR-11-INBS-0001), as well as a grant from the Regional Council of Burgundy (reference PARI AGRAL 11). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: piveteau@u-bourgogne.fr

Introduction

Understanding the ecology of pathogenic microorganisms is critical in order to control associated health hazards. The presence of food-borne pathogens in the farm environment increases the risk of transfer to animals and plant raw products and eventually to food. Soil and water environments may be reservoirs of human pathogens such as pathogenic *Escherichia coli* [1-3], *Pseudomonas aeruginosa* [3,4], *Clostridium perfringens* [5], *Staphylococcus aureus* [3,6] and *Listeria monocytogenes* [7,8]. *L. monocytogenes* which is the causative agent of listeriosis, a serious food-borne infection affecting essentially immuno-compromised individuals, the elderly and pregnant women [9] is found in the environment. It has been isolated from water systems [8,10], vegetation [11], soil [7], farms [12-15], food industries [16-18] and faeces of animals [19-21]. So far, ecosystem characteristics that affect the fate of the pathogen in natural environments are poorly understood. Reports on the survival of *L. monocytogenes* in soil suggest that abiotic edaphic factors such as the clay content or pH of soils as well as biotic factors [7,12,22-24] may affect survival. However, biotic and abiotic factors are

intertwined in soils and these reports do not clearly state the contribution of soil microbiota to the fate of *L. monocytogenes* in soil.

Current theories of ecology addressing plants and animals may be relevant to the understanding of the fate of microorganisms introduced in natural environments. Moreover, microbial experimental set-ups may be useful to confirm current ecology theories [25]. Biological invasion is one of these theories. Developed in the fifties, it postulates that high species diversity protects ecosystems from invasion by alien species [26]. Further investigations confirmed this hypothesis and showed that, at small spatial scales, high species diversity of plant and animal communities was an effective biological barrier that decreased invader success [27-31]. A combination of improved resource utilisation limiting nutrient availability and increased competition may explain these observations [27,32]. Reports addressing the role of soil microbial diversity and putative mechanisms in the biological barrier against microbial invasion are limited. Pathogenic *Escherichia coli* [33] and *Pseudomonas aeruginosa* [34] were studied as invading microorganisms, but in these studies, microbial diversity was partially characterised through fingerprinting analyses, which

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Diversity Affects *L. monocytogenes* Soil Survival

precludes the accurate assessment of microbial diversity parameters.

The main objective of this study was to investigate if, as proposed by the theory of biological invasion, soil microbial species diversity could act as a biological barrier preventing invasion by *L. monocytogenes*. In other words, we addressed the consequences of soil diversity erosion on the fate of a human bacterial pathogen in the telluric environment. We constructed microcosms with similar bacterial abundance but with altered soil microbial diversity through a dilution-to-extinction approach and we characterised the resulting bacterial diversity by high throughput pyrosequencing. The fate of inoculated *L. monocytogenes* was then monitored and survival patterns were analyzed with regards to the taxonomic profiles of the constructed microcosms.

Materials and Methods

Soil and soil extract

Soil was sampled in a pasture located in Burgundy. This sampling site belongs to a country-wide soil sampling network (RMQS) based on a 16 x 16 km systematic grid covering the whole of France [35]. Collection of soil sample was performed on private land with the consent of the land owner. Only soil was sampled. Endanger species were not present in the pasture and none were sampled. Twenty-five individual core samples of topsoil (0–30 cm) were taken using a sampling design within an area of 20 x 20 m. The core samples were then mixed to obtain a composite sample. The soil sample was then sieved to 5 mm. Aliquots of the soil were treated by γ -irradiation (45 Kgy minimum) by Ionisos (Dagneux, France). Soil's attributes such as location, pedology, chemistry and land use are stored in the DONESOL database [36]. Briefly, it is a clay soil with neutral pH. Organic carbon and nitrogen content were respectively 35.3 and 3.9 g.kg⁻¹.

γ -sterilised soil extract was prepared according to Pochon and Tardieux method with some modifications. Five hundred g of soil were mixed in 750 ml of water for 30 minutes at 120 rpm and autoclaved 1 hour at 130°C. Soil suspensions were centrifuged at 10 000 g for 20 minutes and supernatants were filtered on Whatman paper (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The particle-free soil extract obtained was used as sterile diluent after autoclaving (20 minutes, 120°C).

Dilution-to-extinction setup and microcosms preparation

One hundred g of soil were blended in 300 ml of water for 1.5 minutes in a waring blender. The soil suspension was serially diluted in sterilised soil extract. The undiluted, 10⁻²-diluted and 10⁻⁴-diluted suspensions were inoculated in 50 g γ -sterilised soil in order to reach soil moisture at 60% water-holding capacity. Triplicate microcosms were built up for each of the three diversity levels. Soil microcosms were incubated in the dark at 20°C over a 32-days period. Bacterial communities implantation in γ -sterilised soil was followed by enumeration on nutrient agar (3 g.l⁻¹ beef extract, 5 g.l⁻¹ peptone, 15 g.l⁻¹ agar) supplemented with 100 μ g.ml⁻¹ cycloheximide (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) to suppress fungi. Soil

samples were collected and kept frozen at -20°C for subsequent DNA extraction and analyses by real time PCR and pyrosequencing. Abundance was PCR quantified by measuring the number of 16S and 18S rDNA fragments per g of soil by using a standard curve approach.

Bacterial strain

L. monocytogenes L9 [37], a spontaneous rifampicin resistant mutant of *L. monocytogenes* strain EGD-e was used in this study. Inocula were prepared by incubating the strain statically at 25°C for 16 h in 5 ml of trypton soy broth (TSB; AES Chemunex, Bruz, France) and subculturing into 10 ml of fresh TSB to an O.D._{600nm} of 0.4.

Soil invasion assays

Cultures were centrifuged at 8000 g for 5 minutes at room temperature and the pellets were suspended in NaCl (0.85%). Fifty g soil microcosms were inoculated to a final concentration of 2.10⁶ CFU.g⁻¹ of soil. Triplicate microcosms were inoculated with three independent inocula. The 9 soil microcosms were then incubated in the dark at 25°C. *L. monocytogenes* L9 populations were enumerated by serial plating on Polymyxin-Acriflavin-Lithium-Chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol agar (PALCAM; AES Chemunex, Bruz, France) supplemented with 100 μ g.l⁻¹ cycloheximide and rifampicin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) immediately after inoculation and periodically over a 30-days period.

DNA extraction

To extract DNA from soil sample, mechanical and chemical lyses with high temperature were used. Two g of soil were added to 8 ml of lysis buffer (tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 2%, ultra pure H₂O) supplemented with 4 g of silica beads (100 μ m), 5 g of ceramic beads (1.4 mm) and 8 glass beads (4 mm). This mixture was shaken in a Fast Prep (MP Bio, Illkirch Graffenstaden, France) during 3 cycles (4 m.s⁻¹, 30 seconds) and incubated at 70°C for 30 minutes to disrupt the cells. The sample was then centrifuged at 7 000 g for 5 minutes at room temperature and potassium acetate (3 M, pH 5.5) was added to the supernatant (1:10 v/v). The mixture was incubated on ice for 10 minutes and centrifuged (14 000 g for 5 minutes at 4°C). The aqueous phase was then precipitated with an equal volume of isopropanol (-20°C), washed and dried. The pellet was suspended in 130 μ l of ultra pure water and purified once on polyvinyl polypyrrolidone (PVPP; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) columns and then on GeneClean® columns (MP Bio, Illkirch Graffenstaden, France). DNA concentration was estimated with the Quant-iT dsDNA Assay kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Pyrosequencing of 16S rDNA genes sequences

Microbial diversity was analysed by 454 pyrosequencing, a molecular technique allowing a rapid and massive production of targeted DNA sequences [38]. A 16S rRNA gene fragment of 440 bases was amplified from DNA extracts using the primers 479F (5'-CAGCMGCYGCNGTAANAC-3') and 888R (5'-

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Diversity Affects *L. monocytogenes* Soil Survival

CCGYCAATTCMTTTRAGT-3') according to the procedure described by Terrat et al [39]. Briefly, for each soil, 5 ng of DNA were used as template into a 25 µl PCR under the following conditions: 94°C for 2 minutes, 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 52°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute, followed by 7 minutes at 72°C. PCR products were purified using the GenElute™ PCR clean-Up kit (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and quantified using the Quant-iT dsDNA Assay kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Purified PCR products were specifically tagged in a second PCR of 9 cycles, conducted under similar conditions, with ten base pair multiplex identifiers (MIDs) added to the primers at 5' position. PCR products were finally purified and quantified as previously described. Pyrosequencing was then carried out on a GS Junior (Roche 454 Sequencing System).

Analysis of pyrosequencing data using the QIIME pipeline

The generated sequence data were processed by the quantitative insights into microbial ecology (QIIME) pipeline [40]. Briefly, sequences that were less than 300 bp or greater than 500 bp in length, that presented mismatches in the primer sequences, or ambiguous bases were discarded. The remaining sequences were assigned to samples according to their unique MIDs. Chimeric sequences were removed and sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) (97% sequence similarity) using Usearch quality filter (<http://www.drive5.com/usearch/>) [41] and the gold. fa reference set. A representative sequence for each OTU was selected based on the most abundant sequence in each OTU. This representative sequence was used for taxonomic identification using the Ribosomal Database Project (RDP) and the reference data sets from Greengenes. Phylogenetic alignment of sequences was done with the PyNAST program with a minimum length of 150 bp and a minimum percent identity of 75.0 [42]. Once the number of sequence reads had been homogenised between microcosms, alpha diversity was used to describe the microbial richness, diversity and evenness within the constructed microcosms using Chao1 (a nonparametric richness estimator based on distribution of singletons and doubletons), Abundance-based Coverage Estimator (ACE; a nonparametric richness estimator based on distribution of abundant (≥ 10) and rare (< 10) OTUs), Shannon, Inverse Simpson and equitability metrics. β -diversity (diversity between groups of samples) was used to test phylogeny-based community composition among the constructed microcosms using weighted Unique Fraction of branches shared (UniFrac) distances [43,44]. The UniFrac distance matrix was analysed by principal coordinate plots (PCoA) and uncertainty in PCoA plots was estimated using jackknife analysis (jackknife replicate = 10). 3D PCoA plots were used to visualize the similarities or dissimilarities of variables that best represent the pair-wise distances between sample groups.

Statistics

The unilateral Student *t*-test was used to compare richness, diversity and equitability metrics between the undiluted, 10⁻²- and 10⁻⁴-diluted microcosms and the analysis of variance

(ANOVA) to estimate whether or not differences in relative abundance of bacterial phyla and genera occurred in the different microcosms. A Venn diagram [45] was performed to represent the unique genera detected in the constructed microcosms. Moreover, in order to compare survival pattern of *L. monocytogenes* L9 populations in the constructed microcosms over a 30-days period, the repeated-measures ANOVA was performed. Then, Spearman's rank correlations was used to test the dependence between the following variables: survival rate, observed OTUs, Chao1, ACE, Shannon, Inverse Simpson and equitability.

Results

Microbial abundance evaluation in the constructed microcosms

After a period of 32 days to allow colonization of the sterilised soil by the inoculated microorganisms, bacterial abundance did equilibrate in all microcosms (Figure 1). At the end of the equilibration period, populations of culturable microorganisms were stable and similar abundances of approximately 5. 10⁸ cells per gram of soil were numerated in all microcosms. In a control γ -irradiated soil microcosm, no culturable microorganisms could be detected over a 62 days period. In agreement with plate counting data, qPCR results showed that all constructed microcosms harboured a similar (student *t*-test, *P* < 0.05) microbial abundance level (Figure 2).

Richness, diversity and evenness of the constructed microcosms

We determined the level of bacterial richness, diversity and evenness within samples as a marker of the effectiveness of the dilution-to-extinction approach. OTUs were estimated by the Chao1 metric and by the ACE metric in the undiluted, 10⁻²- and 10⁻⁴-diluted microcosms (Table 1). Statistical analyses (unilateral student *t*-test, *P* < 0.05) indicated that the estimated bacterial species richness was similar in all constructed microcosms. However, contrary to bacterial richness, the Shannon and Inverse Simpson metrics suggested that bacterial diversity differed between microcosms (Table 1) and that diversity was significantly higher in the undiluted microbiota (unilateral student *t*-test, *P* < 0.05). In spite of the initial 100-fold dilution between the 10⁻²- and 10⁻⁴-diluted microbiotas, the differences of bacterial diversity were not significant (unilateral student *t*-test, *P* < 0.05). Moreover, the representativeness of each OTU followed similar patterns to those observed for diversity metrics (Table 1). Indeed, evenness gradually decreased from the undiluted microbiota, which presented the highest evenness, to the 10⁻⁴-diluted microbiota where evenness was at its lowest level (unilateral student *t*-test, *P* < 0.05).

Phylogenetic and taxonomic profiles

Differences were further characterised by comparing phylogenetic and taxonomic profiles. The 3D PCoA plots visualization (Figure 3) explained over 87% of the variation of microbiotas. Principal coordinate 1 explained 67% of the

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Diversity Affects *L. monocytogenes* Soil Survival

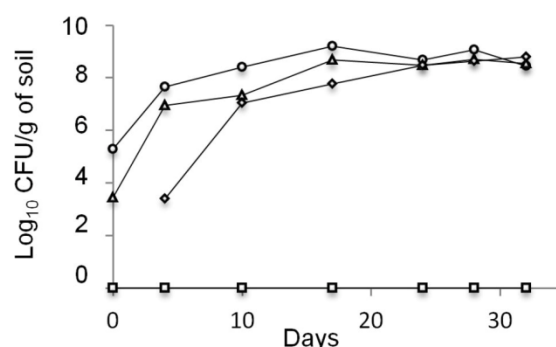


Figure 1. Bacterial communities implantation in γ -sterilised soils over a 32-days period. Undiluted (○), 10²- (Δ) and 10⁴-diluted (◇) populations and control sterilized soil (□).

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.g001

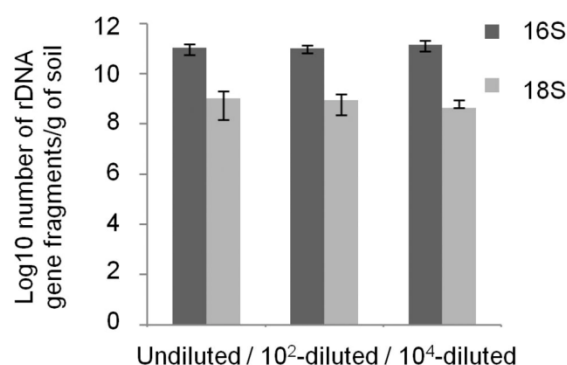


Figure 2. Abundance of 16S and 18S rDNA gene fragments in the constructed microcosms. The number of rDNA gene fragments were determined by real time quantitative PCR from a standard curve relating the quantity of rDNA fragments as a function of the Ct value. The errors bars represent standard deviation from three replicate samples value.

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.g002

Table 1. Bacterial richness, diversity and evenness at a genetic distance of 5%.

Treatment	Observed OTUs	Chao1	ACE	Shannon**	Inverse Simpson*	Equitability*
Undiluted	927 ± 92	1508 ± 284	1680 ± 326	8.57 ^a ± 0.22	155 ^a ± 34	0.87 ^a ± 0.02
10 ² -diluted	925 ± 132	1849 ± 406	2070 ± 450	8.24 ^{ab} ± 0.35	101 ^b ± 30	0.84 ^{ab} ± 0.03
10 ⁴ -diluted	939 ± 75	1775 ± 205	1976 ± 260	8.22 ^b ± 0.21	85 ^b ± 23	0.83 ^b ± 0.02

Richness is expressed as the number of observed unique operational units (OTUs) and has been estimated by the estimator Chao1 and the abundance-based coverage estimator (ACE). Diversity is expressed by the Shannon and the Inverse Simpson index. Evenness is measured as the ratio of Shannon index and the number of observed OTUs. Standard deviation was measured from three replicate samples value. Letters indicate values with significant differences after Student test (unilateral t-test, *P < 0.05, **P < 0.08).

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.t001

variation in the data and distinguished the three diversity levels, with undiluted and 10⁴-diluted microbiota being strongly discriminated and 10²-diluted microbiota represented an intermediate situation. According to the UniFrac tree-based metric, phylogenetic profiles of the three constructed microbiotas were significantly different. Moreover the UPGMA

cluster tree also clustered the constructed microcosms according to the dilution treatment (Figure 4). It also indicates that phylogenetic profile of the undiluted microbiota is closer to the 10²-diluted than the 10⁴-diluted phylogenetic profile.

From all sequences that were assigned to the domain Bacteria, a total of 21 phyla were detected (Table 2). Among

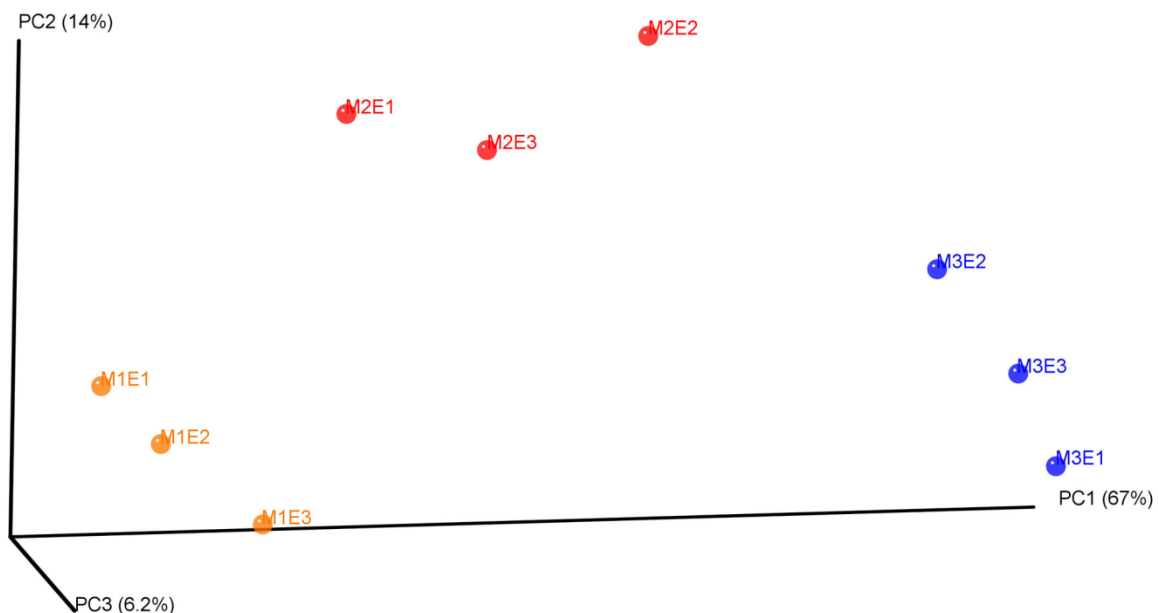


Figure 3. β -diversity analysis of the microcosms composition. Phylogenetic dataset analyzed using jackknifed PCoA of the weighted pairwise UniFrac distances. The undiluted, 10^2 - and 10^4 -diluted microbiotas are respectively represented by orange, red and blue plain circles.

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.g003

the abundant phyla (>1% of total reads), the relative abundance of the *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes* significantly diverged depending on the diversity level (ANOVA, Tukey test, $P < 0.05$). Indeed, the relative abundance of *Proteobacteria* significantly decreased over the dilution treatment. On the contrary, the relative abundance of *Actinobacteria* significantly increased from 25% in the undiluted microcosm to 42% and 40% in the 10^2 - and 10^4 -diluted microcosms, respectively. The relative abundance of *Firmicutes* was significantly higher in the 10^4 -diluted microcosms (28%) but the differences between the undiluted and 10^2 -diluted were not statistically significant. Moreover, the *Planctomycetes* decreased down to extinction in the 10^4 -diluted. Finally, similar abundance of *Bacteroidetes* was detected in all microcosms.

To complete the characterization of the constructed microcosms, taxonomic assignment was done at the class and genus levels. Fifty three classes were detected from the assigned sequences, of which 10 classes were abundant (Figure 5). *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* were detected in all microcosms and *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* alone accounted for over 84% of the phylum. In all microcosms, the phylum *Firmicutes* was represented by the *Clostridia* and *Bacilli*. The relative abundance of *Clostridia* did not vary significantly while *Bacilli* were more abundant in the 10^4 -diluted microcosms compared to the undiluted and 10^2 -diluted microcosms that were not

statistically different (ANOVA, Tukey, $P < 0.05$). *Planctomycetes*, *Sphingobacteria* and *Actinobacteria* respectively were the only classes detected for the phyla *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. Concerning genus taxonomic assignment, 370 genera were detected, 38 as abundant (> 1% of total reads) and 332 as rare genera (< 1% of total reads).

Among the abundant genera, the relative abundance of 6 of them significantly differed among the constructed microcosms (Table 3). In addition, microcosms also differed in terms of rare genera (Table S1). Among the 332 rare genera, 27, 28 and 32 specific genera were respectively detected in the undiluted, 10^2 - and 10^4 -diluted microcosms and 31, 31 and 11 rare genera were respectively shared between the undiluted and 10^2 -diluted, 10^2 - and 10^4 -diluted and the undiluted and 10^4 -diluted microcosms (Figure 6).

As expected, phylogenetic and taxonomic data confirmed that the dilution-to-extinction method generated significant dissimilarities between microcosms at the phylum, class and genus levels.

Invasion of the pathogen

In natural soil microcosms, a progressive decline of *L. monocytogenes* L9 was observed (Figure 7). Over 5 log decrease was recorded during the first fourteen days of incubation and the population was no longer detected after this period. A similar pattern was observed in the undiluted microcosms. A decline was also observed in the 10^2 -diluted

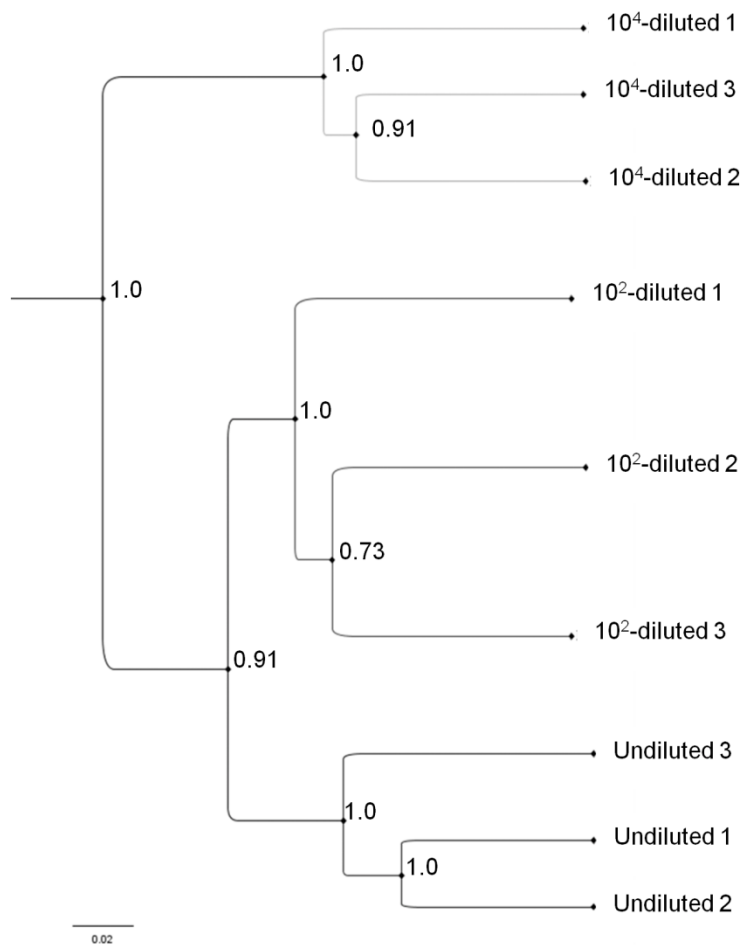


Figure 4. Jackknifed Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) cluster tree of the constructed microcosms. UPGMA clustering was made from the 10 jackknifed weighted UniFrac distance matrix generated for each constructed microcosm.

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.g004

Table 2. Phylogenetic communities composition of microcosms.

Phylum	Undiluted	10 ² -diluted	10 ⁴ -diluted
Proteobacteria	56.2 ^a ± 4.4	37.0 ^b ± 7.7	27.5 ^c ± 2.5
Actinobacteria	25.2 ^a ± 0.5	41.7 ^b ± 4.2	39.5 ^b ± 3.3
Firmicutes	8.8 ^{ab} ± 4.0	16.0 ^b ± 4.7	27.7 ^c ± 1.4
Planctomycetes	1.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0
Bacteroidetes	3.6 ± 0.6	1.4 ± 0.7	0.6 ± 0.9
Others	1.9 ± 0.4	2.5 ± 1.0	3.0 ± 0.5

Relative abundance (%) of detected phyla. Phylogenetic groups accounting for less than 1% of all classified sequences are summarized in the artificial group "others". Standard deviation was measured from three replicate samples value. Letters indicate significant differences of relative abundance between microcosms after ANOVA (Tukey test, P < 0.05).

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.t002

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbienne agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Diversity Affects *L. monocytogenes* Soil Survival

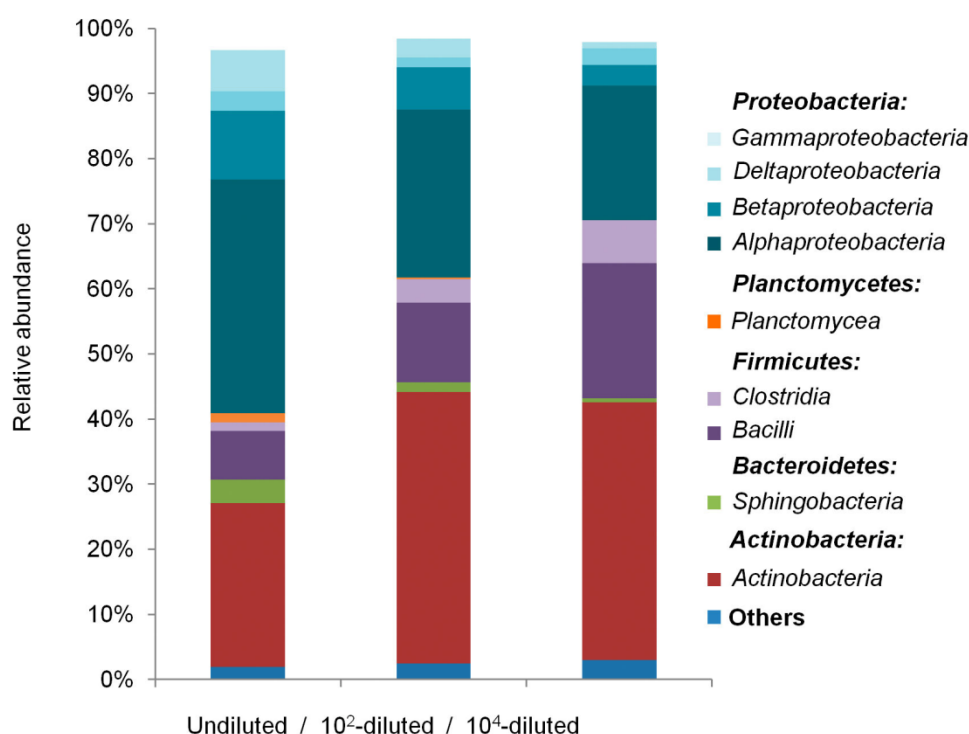


Figure 5. Phylogenetic community composition of microcosms. Relative abundance (%) of detected classes.

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.g005

Table 3. Relative abundance (%) of abundant genera (> 1% of total reads) detected as significantly different between microcosms.

Phylum	Class	Genus	Undiluted	10 ² -diluted	10 ⁴ -diluted
Actinobacteria	Actinobacteria	Unknown member of the O319-7L14	0.4 ^a ± 0.1	4.0 ^a ± 3.3	13.4 ^b ± 2.3
Actinobacteria	Actinobacteria	Kribella	4.2 ^a ± 1.3	6.4 ^a ± 3.4	1.1 ^b ± 0.5
Actinobacteria	Actinobacteria	Other member of the Streptomyetaceae*	3.1 ^a ± 0.8	7.8 ^b ± 3.1	3.9 ^{ab} ± 2.6
Actinobacteria	Actinobacteria	Streptomyces	4.4 ^{ab} ± 0.6	7.7 ^a ± 4	3.2 ^b ± 1.2
Firmicutes	Bacilli	Other member of the Bacillales**	4.3 ^a ± 3.1	7.3 ^a ± 2.4	14.5 ^b ± 1.6
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Other member of the Comamonadaceae***	5.8 ^a ± 3.4	4.6 ^{ab} ± 3.5	1.3 ^b ± 1.3

*. Other member of the Streptomyetaceae: other than Kitasatospora and Streptomyces.

**.. Other member of the Bacillales: other than Alicyclobacillus, Bacillus, Geobacillus, Ammoniphilus, Brevibacillus, Cohnella, Paenibacillus, Kurthia, Paenisporosarcina, Rummeliibacillus, Solibacillus, Sporosarcina, Ureibacillus and Viridibacillus.

***. Other member of the Comamonadaceae: other than Polaromonas, Variovorax and Xenophilus.

Standard deviation was measured from three replicate samples value. Letters indicate values with significant differences after ANOVA (Tukey test, P < 0.05).

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.t003

microcosms but the decrease was significantly lesser (ANOVA, P < 0.05) than in the natural and undiluted microcosms, with only 4 log decrease observed 14 days after inoculation. Moreover, populations remained detectable up to day 21. In the 10⁴-diluted microcosms, populations were stable during the first four days of incubation. After this period, a decrease was observed and the relative abundance of *L. monocytogenes* L9 remained significantly higher (ANOVA, P < 0.05) throughout

the duration of the experiment. Indeed, 2 log and 4 log decreases were respectively recorded at days 14 and 21. Furthermore, populations were still detected up to the end of the experiment. Finally, in the absence of microflora, *L. monocytogenes* L9 populations increased of over 2 log within the first four days of incubation, and the relative abundance of the population was stable until the end of the experiment.

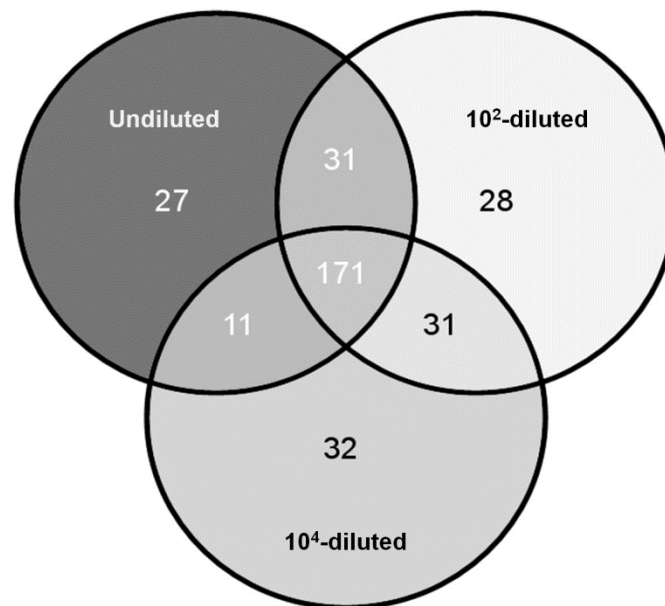


Figure 6. Venn diagram representing shared and unique rare genera (< 1% of total reads) of microcosms.

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.g006

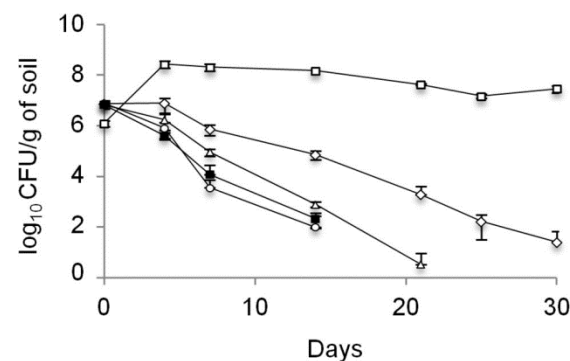


Figure 7. *L. monocytogenes* L9 survival over a 30-days period. In a natural soil (■), in the constructed soil microcosms with established undiluted (○), 10^2 - (Δ) and 10^4 -diluted (◊) microbiotas and in a γ -sterilised soil (□). The errors bars represent standard deviation from three replicate samples value.

doi: 10.1371/journal.pone.0076991.g007

The Spearman rank correlation test was used to check correlations between the survival rate of *L. monocytogenes* L9 and the richness, diversity and evenness metrics of the constructed microcosms. The dependence of the survival rate was tested with the observed OTUs, Chao1, ACE, Shannon, Inverse Simpson and equitability. From these six metrics, a significant negative correlation was detected between the survival rate and the Inverse Simpson ($\rho_s = -0.817$, $P < 0.05$) and also between the survival rate and the evenness metric ($\rho_s = -0.717$, $P < 0.05$).

Discussion

Although *L. monocytogenes* is considered as a telluric bacterium, its ecology in soil is poorly understood. In this study, we investigated whether microbial species diversity is a major driver of the ecosystem service of control of pathogenic organisms. We experimentally eroded soil microbial diversity and characterised the induced differences by high throughput pyrosequencing of bacterial 16S rDNA. The erosion process generated diversity and evenness gradients. As expected, the highest differences were observed between the undiluted and

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Diversity Affects *L. monocytogenes* Soil Survival

the 10⁻⁴-diluted microcosms while it was intermediate in the 10⁻²-diluted microcosms. Taxonomic assignments further evidenced these changes. Among the 21 phyla detected, a third was detected as abundant. The erosion process resulted in a significant decrease of the relative abundance of *Proteobacteria* and members of the *Planctomycetes* were eventually not recovered. Conversely the relative abundance of *Actinomycetes* and *Firmicutes* increased in the most eroded microcosms. These differences could be assigned to the variation of the relative abundance of six genera identified as abundant. Investigation of the phylogenetic assignment of rare genera did illustrate further dissimilarities between microcosms. Indeed, unique groups were detected within each microcosm. These alterations of the phylogenetic composition and diversity are consistent with results of other studies manipulating diversity in microbial systems [46-49]. These studies showed that the structure, diversity, functional traits or stability of the communities were affected by dilution.

L. monocytogenes invasion was significantly lower in the most diverse, undiluted microcosms. This result provides evidence that highly diverse soil microbial communities may act as a barrier against *L. monocytogenes* invasion. This was supported by Spearman's rank correlations test which showed a negative correlation between the level of diversity and the survival rate of *L. monocytogenes* in soil microcosms. These results demonstrate, at a microbial scale, that diversity is a major provider of the biological barrier of ecosystems against biological invasion. This is in accordance with the current ecological theory of biological invasion that highlights the correlation between the degree of diversity and the protection of the ecosystem from invasive species [26].

Moreover, another dimension of microbial community composition has to be considered. Indeed, the barrier effect against *L. monocytogenes* invasion was lesser in the 10⁻⁴-diluted than in the 10⁻²-diluted constructed microcosms although bacterial diversity and evenness were similar. However, analyses at the genus level showed significant differences between these microcosms, suggesting that the actual phylogenetic composition of the indigenous community may also contribute to the barrier effect. Recent reports showed that

phylogenetically diverse soil communities favour soil ecosystem stability and functioning [50-53]. Similarly, assembly of complementary plant and animal species increases functioning and protection against invasion [54,55]. As a rule, components of microbial ecosystems engage in complex interactions that regulate microbial communities [56]. From our results, one can assume that at a same level of species diversity, complementary species and interactions within the complex soil communities can direct the fate of invading microorganisms.

Overall, this study highlights the critical role that microbial diversity and structure play in the biological barrier effect of soil against invasion by pathogenic bacteria. This suggests that, in the environments, soil diversity and phylogenetic composition may impact the fate and circulation of pathogenic microorganisms and thus the overall associated health hazard. Moreover, this study confirms that the body of ecological theory developed to explain biological invasion by plants and animals does apply to microorganisms. As demonstrated in this study, microbial models are useful to address experimentally ecology theories and concepts while the understanding of the ecology of microorganisms requires the input of ecological theory [25]. Further work is required in order to address the relative weight of the degree of diversity versus the phylogenetic composition of soil microbiota in the biological barrier that these microorganisms promote against invasion by pathogenic bacteria.

Supporting Information

Table S1. Relative abundance of rare genera detected in the constructed microcosms.
(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ALV DG PP. Performed the experiments: ALV VN. Analyzed the data: ALV PP. Wrote the manuscript: ALV DG PAM PP.

References

1. Forslund A, Ensink JHJ, Markussen B, Battilani A, Psarras G et al. (2012) *Escherichia coli* contamination and health aspects of soil and tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) subsurface drip irrigated with on-site treated domestic wastewater. *Water Res* 46: 5917-5934. doi: 10.1016/j.watres.2012.08.011. PubMed: 22944202.
2. Ma JC, Ibekwe AM, Crowley DE, Yang CH (2012) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in major leafy green producing soils. *Environ Sci Technol* 46: 12154-12161. doi:10.1021/es302738z. PubMed: 23030401.
3. Morales A, Garland JL, Lim DV (1996) Survival of potentially pathogenic human-associated bacteria in the rhizosphere of hydroponically grown wheat. *FEMS Microbiol Ecol* 20: 155-162. doi: 10.1111/j.1574-6941.1996.tb00314.x. PubMed: 11539850.
4. Nonaka L, Inubushi A, Shinomiya H, Murase M, Suzuki S (2010) Differences of genetic diversity and antibiotics susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital, river and coastal seawater. *Environ Microbiol Rep* 2: 465-472. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00178.x. PubMed: 23766122.
5. Voidarou C, Bezirtzoglou E, Alexopoulos A, Plessas S, Stefanis C et al. (2011) Occurrence of *Clostridium perfringens* from different cultivated soils. *Anaerobe* 17: 320-324. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.05.004. PubMed: 21621626.
6. Schulz J, Friese A, Klees S, Tenhagen BA, Fetsch A et al. (2012) Longitudinal study of the contamination of air and of soil surfaces in the vicinity of pig barns by livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 78: 5666-5671. doi: 10.1128/AEM.00550-12. PubMed: 22685139.
7. Dowe MJ, Jackson ED, Mori JG, Bell CR (1997) *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *J Food Protect* 60: 1201-1207.
8. Garrec N, Picard-Bonnaud F, Pourcher AM (2003) Occurrence of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. *FEMS Immunol Med MIC* 35: 275-283. doi:10.1016/S0928-8244(02)00443-1.
9. Cossart P, Toledo-Arana A (2008) *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* 10: 1041-1050. doi:10.1016/j.micinf.2008.07.043. PubMed: 18775788.
10. De Luca G, Zanetti F, Fateh-Moghadam P, Stampi S (1998) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in sewage sludge. *Zent BI Hyg Umweltmed* 201: 269-277.

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Diversity Affects *L. monocytogenes* Soil Survival

11. Beuchat LR (1996) *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. Food Control 7: 223-228. doi:10.1016/S0956-7135(96)00039-4.
12. Moshtaghi H, Garg SR, Mandokhot UV (2009) Survivability of *Listeria monocytogenes* in agricultural field soil. Indian J Vet Res 18: 1-7.
13. Latorre AA, Kessel JASV, Karns JS, Zurakowski MJ, Pradhan AK et al. (2009) Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. Appl Environ Microbiol 75: 1315-1323. doi:10.1128/AEM.01826-08. PubMed: 19114514.
14. Latorre AA, Kessel JASV, Karns JS, Zurakowski MJ, Pradhan AK et al. (2010) Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. J Dairy Sci 93: 2792-2802. doi:10.3168/jds.2009-2717. PubMed: 20494189.
15. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ et al. (2010) Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Appl Environ Microbiol 70: 4458-4467. doi:10.1128/AEM.70.8.4458-4467.2004. PubMed: 15294773.
16. Garrido V, Vitas AI, Garcia-Jalon I (2009) Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. Food Control 20: 986-991. doi:10.1016/j.foodcont.2008.11.013.
17. Goulet V, Rocourt J, Rebiere I, Jacquet C, Moysse C et al. (1998) Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. J Infect Dis 177: 155-160. doi:10.1086/513814. PubMed: 9419182.
18. Van Houdt R, Michiels CW (2010) Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. J Appl Microbiol 109: 1117-1131. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x. PubMed: 20522145.
19. Fenlon DR (1985) Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. J Bacteriol 59: 537-543. doi:10.1111/j.1365-2672.1985.tb03357.x. PubMed: 3938452.
20. Ho AJ, Ivanek R, Gröhn YT, Nightingale KK, Wiedmann M (2007) *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. Prev Vet Med 80: 287-305. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.03.005. PubMed: 17481754.
21. Iida T, Kanzaki M, Maruyama T, Inoue S, Kaneuchi C (1991) Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. J Vet Med Sci 53: 873-875. doi:10.1292/jvms.53.873. PubMed: 1836374.
22. McLaughlin HP, Casey PG, Cotter J, Gahan CGM, Hill C (2011) Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. Arch Microbiol 193: 775-785. doi:10.1007/s00203-011-0716-7. PubMed: 21611773.
23. Piveteau P, Depret G, Pivato B, Garmyn D, Hartmann A (2011) Changes in gene expression during adaptation of *Listeria monocytogenes* to the soil environment. PLOS ONE 6: e24881. doi:10.1371/journal.pone.0024881. PubMed: 21966375.
24. Xiuping J, Islam M, Morgan J, Doyle MP (2004) Fate of *Listeria monocytogenes* in bovine manure-amended soil. J Food Protect 67: 1676-1681.
25. Prosser JI, Bohannon BJM, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK et al. (2007) Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. Nat Rev Microbiol 5: 384-392. doi:10.1038/nrmicro1643. PubMed: 17435792.
26. Elton CS (1958) The ecology of invasions by animals and plants. London: University of Chicago Press. 196pp.
27. Fargione JE, Tilman D (2005) Diversity decreases invasion via both sampling and complementarity effects. Ecol Lett 8: 604-611. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00753.x.
28. Tilman D (1999) The ecological consequences of changes in biodiversity: A search for general principles. Ecology 80: 1455-1474. doi:10.2307/176540.
29. Levine JM (2000) Species diversity and biological invasions: Relating local process to community pattern. Science 288: 852-854. doi:10.1126/science.288.5467.852. PubMed: 10797006.
30. Case TJ (1990) Invasion resistance arises in strongly interacting species-rich model competition communities. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 9610-9614. doi:10.1073/pnas.87.24.9610. PubMed: 11607132.
31. Kennedy TA, Naeem S, Howe KM, Knops JMH, Tilman D et al. (2002) Biodiversity as a barrier to ecological invasion. Nature 417: 636-638. doi:10.1038/nature00776. PubMed: 12050662.
32. Levine JM, D'Antonio CM (1999) Elton revisited: a review of evidence linking diversity and invasibility. Oikos 87: 15-26. doi:10.2307/3546992.
33. Van Elsas JD, Chiurazzi M, Mallon CA, Elhottova D, Kristufek V et al. (2012) Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 1159-1164. doi:10.1073/pnas.1109326109. PubMed: 22232669.
34. Matos A, Kerkhof L, Garland JL (2005) Effects of microbial community diversity on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the wheat rhizosphere. Microb Ecol 49: 257-264. doi:10.1007/s00248-004-0179-3. PubMed: 15965723.
35. Arrouays D, Jolivet C, Boulonne L, Bodineau G, Saby N et al. (2002) A new initiative in France: a multi-institutional soil quality monitoring network. Comp R Acad Agric Fr 88: 93-103.
36. Grolleau E, Bargeot L, Chafchafi A, Hardy R, Doux J et al. (2004) Le système d'information national sur les sols : DONESOL et les outils associés. Etude et Gestion Des sols 11: 255-269.
37. Lemunier M, Francou C, Rousseaux S, Houot S, Dantigny P et al. (2005) Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. Appl Environ Microbiol 71: 5779-5786. doi:10.1128/AEM.71.10.5779-5786.2005. PubMed: 16204488.
38. Maron PA, Mougél C, Ranjard L (2011) Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. Comp R Biol 334: 403-411. doi:10.1016/j.crv.2010.12.003. PubMed: 21640949.
39. Terrat S, Christen R, Dequiedt S, Lelièvre M, Nowak V et al. (2012) Molecular biomass and MetaTaxonomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. J Microbiol Biotechnol 5: 135-141. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00307.x. PubMed: 21989224.
40. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods 7: 335-336. doi:10.1038/nmeth.f.303. PubMed: 20383131.
41. Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26: 2460-2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461. PubMed: 20709691.
42. Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL et al. (2010) PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. Bioinformatics 26: 266-267. doi:10.1093/bioinformatics/btp636. PubMed: 19914921.
43. Lozupone C, Ladsler ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R (2010) UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. ISME J 5: 169-172. PubMed: 20827291.
44. Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 71: 8228-8235. doi:10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005. PubMed: 16332807.
45. Oliveros JC (2007) VENN. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams. Available: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
46. Franklin RB, Mills AL (2006) Structural and functional responses of a sewage microbial community to dilution-induced reductions in diversity. Microb Ecol 52: 280-288. doi:10.1007/s00248-006-9033-0. PubMed: 16897310.
47. Garland JL, Lehman RM (1999) Dilution/extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities. FEMS Microbiol Ecol 30: 333-343. doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00661.x. PubMed: 10568842.
48. Baumann K, Dignac MF, Rumpel C, Bardoux G, Sarr A et al. (2012) Soil microbial diversity affects soil organic matter decomposition in a silty grassland soil. Biogeochemistry. doi:10.1007/s10533-012-9800-6.
49. Philippot L, Spor A, Hénault C, Bru D, Bizouard F et al. (2013) Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. ISME. p. 7; e-pub ahead of print 10.1038/ismej.2013.34.
50. Hallin S, Welsh A, Stenström J, Hallett S, Enwall K et al. (2012) Soil functional operating range linked to microbial biodiversity and community composition using denitrifiers as model guild. PLOS ONE 7: e51962. doi:10.1371/journal.pone.0051962. PubMed: 23284833.
51. Maherali H, Klironomos JN (2007) Influence of Phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. Science 316: 1746-1748. doi:10.1126/science.1143082. PubMed: 17588930.
52. Strickland MS, Lauber C, Fierer N, Bradford MA (2009) Testing the functional significance of microbial community composition. Ecology 90: 441-451. doi:10.1890/08-0296.1. PubMed: 19323228.
53. Griffiths BS, Hallett PD, Kuan HL, Gregory AS, Watts CW et al. (2008) Functional resilience of soil microbial communities depends on both soil structure and microbial community composition. Biol Fertil Soils 44: 745-754. doi:10.1007/s00374-007-0257-z.
54. Allan E, Weisser W, Weigelt A, Roscher C, Fischer M et al. (2011) More diverse plant communities have higher functioning over time due to turnover in complementary dominant species. Proc Natl Acad Sci U

Chapitre 4. La diversité et la structure des communautés microbiennes agissent comme une barrière biologique contre l'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le sol

Diversity Affects *L. monocytogenes* Soil Survival

- S A 108: 17034-17039. doi:10.1073/pnas.1104015108. PubMed: 21949392.
55. Law R, Morton RD (1995) Permanence and the assembly of ecological communities. *Ecology* 77: 762-775.
56. Little AEF, Robinson CJ, Peterson SB, Raffa KE, Handelsman J (2008) Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu Rev Microbiol* 62: 375-401. doi:10.1146/annurev.micro.030608.101423. PubMed: 18544040.

3. Bilan

Les résultats présentés dans cet article indiquent que le procédé d'érosion a généré des gradients de diversité et d'équitabilité au sein des microcosmes de sol. Comme attendu, la plus grande diversité a été observée dans les microcosmes non dilués et la plus faible dans les microcosmes fortement dilués (dilution 10^{-4}). Ce procédé a également permis d'obtenir des communautés de composition phylogénétique différentes. La proportion en Protéobactéries, Firmicutes et Actinomycetes diffèrent notamment. De plus, des genres uniques à certains microcosmes ont été identifiés.

La survie de *L. monocytogenes* a été significativement amoindrie dans les microcosmes présentant la plus grande diversité. Ce résultat suggère que les communautés microbiennes fortement diversifiées peuvent agir comme une barrière biologique face à l'invasion de *L. monocytogenes*. De plus, la composition phylogénétique des communautés microbiennes est à prendre en compte. A diversité et équitabilité équivalente, la dynamique des populations de *L. monocytogenes* varie. Des phénomènes de coopération et/ou de compétition peuvent apparaître et diverger selon la composition phylogénétique des communautés.

Cette étude expérimentale permet de progresser dans la connaissance de l'écologie de *L. monocytogenes* dans le sol. La diversité et la structure des communautés microbiennes jouent un rôle critique contre l'invasion de pathogènes en agissant comme une barrière biologique. Ceci suggère que dans l'environnement la diversité du sol et la composition phylogénétique pourraient impacter le devenir et la circulation de pathogènes, et les problèmes sanitaires associés.

Discussion et Perspectives

L. monocytogenes est une bactérie pathogène ubiquiste. Elle est présente dans de multiples environnements tels que l'eau et les effluents de stations d'épuration (Schaffter *et al.*, 2004, Paillard *et al.*, 2005, Lyautey *et al.*, 2007b), la végétation (Welshimer, 1968, Fenlon, 1985, Beuchat, 1996), les fermes agricoles (Nightingale *et al.*, 2004, Latorre *et al.*, 2009, Moshtaghi *et al.*, 2009), les industries agroalimentaires (Goulet *et al.*, 1998, Holah *et al.*, 2004, Garrido *et al.*, 2009), les fèces des animaux (Fenlon, 1985, Iida *et al.*, 1991, Ho *et al.*, 2007), et le sol (Welshimer & Donker-Voet, 1971, Dowe *et al.*, 1997, Locatelli *et al.*, 2013a). Les voies de transfert d'un habitat à l'autre sont multiples. Le sol joue un rôle central dans le transfert du pathogène. Sa présence dans l'environnement tellurique peut entraîner un risque sanitaire du fait de son possible transfert vers les végétaux et les animaux destinés à la consommation humaine. Malgré cela, l'écologie de *L. monocytogenes* dans le sol est très peu étudiée. Ainsi, les travaux réalisés dans ce projet ont permis d'apporter des éléments de compréhension quant à la persistance et la survie de *L. monocytogenes* dans le sol et les leviers utilisés par la bactérie pour s'adapter à cet environnement.

La dynamique des populations de *L. monocytogenes* dans le sol dépend du sol considéré. Chaque sol doit être considéré comme un habitat unique qui se caractérise par une combinaison de facteurs abiotiques et biotiques. Dans l'ensemble des sols étudiés au cours de ce travail, une décroissance des populations de *L. monocytogenes* a été notée. Parmi les facteurs abiotiques de ces sols, le pH et la texture sont les paramètres physico-chimiques qui impactaient le plus la survie de *L. monocytogenes*. Des tendances similaires sont décrites dans la littérature. La survie de *L. monocytogenes* dans le sol est affectée par la texture (Dowe *et al.*, 1997, Locatelli *et al.*, 2013b), le pH (Weis & Seeliger, 1975, McLaughlin *et al.*, 2011, Locatelli *et al.*, 2013b) mais aussi par la température (Xiuping *et al.*, 2004, McLaughlin *et al.*, 2011) et le taux d'humidité (Welshimer, 1960, Weis & Seeliger, 1975). Une étude de la survie de *L. monocytogenes* dans un panel de 100 microcosmes de sol, dont certains sont communs à notre étude, a notamment montré que la survie du pathogène est liée à la proportion d'argile et à l'activité chimique des sols. Les sols neutres ou basiques, possédant une forte proportion d'argile sont plus favorables à la survie de *L. monocytogenes* que les sols acides et sableux (Locatelli *et al.*, 2013b). Les facteurs abiotiques et biotiques du sol sont étroitement liés. En effet, les facteurs abiotiques impactent l'ensemble de la communauté biotique du sol. De ce fait, il est difficile d'évaluer la réelle contribution de chacun de ces facteurs sur la dynamique des populations de *L. monocytogenes*. Néanmoins, il est clair que les paramètres biotiques du sol influencent le devenir de *L. monocytogenes* dans cet environnement car la dynamique de

croissance de la bactérie diffère selon que le sol ait été stérilisé ou non. En effet, dans la majorité des sols que nous avons étudiés, l'inactivation du microbiote du sol lève l'inhibition de *L. monocytogenes* et permet sa croissance. Il apparaît que pour de nombreux sols, l'inactivation de la fraction biotique suffit à générer un habitat favorable à la croissance de *L. monocytogenes* comme le montrent d'autres études réalisées avec des sols de nature et de composition différentes (Dowe *et al.*, 1997, Moshtaghi *et al.*, 2009, McLaughlin *et al.*, 2011). L'ensemble de ces résultats suggère que la microflore est le facteur prédominant dans la survie de *L. monocytogenes* mais ils permettent uniquement de démontrer que l'élimination de la microflore tellurique lève l'inhibition de *L. monocytogenes* dans le sol. Afin de savoir si cet effet inhibiteur était lié à l'abondance des microorganismes présents ou au contraire s'il dépendait de la diversité et de la composition des communautés microbiennes telluriques, nous avons suivi la dynamique des populations de *L. monocytogenes* dans des microcosmes de sol dont la diversité microbienne a été érodée par une approche de dilution jusqu'à extinction. Cette technique de dilution jusqu'à extinction a été privilégiée par rapport à l'application de gradients de chaleur, de sel ou d'acide qui peuvent générer un stress et causer la dormance et/ou la sporulation de certains microorganismes. Par des dilutions successives, cette technique permet l'élimination des organismes rares et la structure, la stabilité et la diversité des communautés sont affectées (Garland & Lehman, 1999, Franklin & Mills, 2006, Baumann *et al.*, 2012, Philippot *et al.*, 2013). Avec cette approche, nous avons caractérisé les différences de diversité génotypique bactérienne par séquençage des amplicons d'ADNr 16S. Du fait de la plus forte proportion de bactéries parmi le microbiote tellurique (Gobat *et al.*, 2010), nous avons utilisé la diversité bactérienne comme indicateur de la diversité microbienne globale. Le suivi des populations de *L. monocytogenes* dans ces microcosmes de sol a permis de démontrer que le rôle de barrière biologique de la microflore tellurique contre l'invasion de *L. monocytogenes* dépend de la diversité et de la structure des communautés microbiennes. L'effet barrière des communautés est d'autant plus fort que la diversité microbienne est importante. Les systèmes ayant une diversité microbienne importante présentent une diversité métabolique plus élevée (Hallin *et al.*, 2012). Ainsi, lorsque *L. monocytogenes* est introduite dans un sol hébergeant une communauté microbienne avec une diversité élevée, les ressources pourraient être limitées et leur acquisition sujette à compétition. Les études faisant part d'un lien entre effet barrière et diversité microbienne tellurique contre l'invasion de microorganismes sont limitées. Une tendance similaire à la notre a été observée dans les études utilisant les pathogènes *Escherichia coli* 0157:H7 (van Elsas *et al.*, 2012) et *Pseudomonas aeruginosa* (Matos *et al.*, 2005) comme microorganismes

d'invasion cependant, dans ces études, la diversité microbienne a été caractérisée par des analyses d'empreintes génétiques, ce qui rend la comparaison difficile. Dans le cas de sols aux caractéristiques abiotiques compatibles avec le développement de *L. monocytogenes*, une diversité limitée ou une diminution de la diversité des microorganismes présents pourraient impacter le devenir et la circulation de la bactérie dans le sol.

La diversité des communautés est donc un paramètre biotique influençant la dynamique des populations de *L. monocytogenes* dans le sol. Nos études montrent qu'en plus de la diversité, la nature même des taxons bactériens est à prendre en considération. En effet, l'impact des communautés envers *L. monocytogenes* diffère selon leur composition phylogénétique. Ce phénomène a été décrit dans la littérature pour les communautés végétales et animales. L'assemblage de plantes ou d'animaux complémentaires améliorent le fonctionnement des communautés et la protection contre l'invasion d'espèces endogènes (Law & Morton, 1995, Allan *et al.*, 2011). De façon similaire, pour les communautés microbiennes, la composition phylogénétique des communautés telluriques assure ou au contraire déstabilise le fonctionnement du sol (Maherali & Klironomos, 2007, Griffiths *et al.*, 2008, Strickland *et al.*, 2009, Hallin *et al.*, 2012). De plus, des interactions complexes existent entre microorganismes et régulent les communautés microbiennes (Little *et al.*, 2008). D'après nos résultats, nous pouvons supposer que des interactions au sein des communautés du sol impactent le devenir de microorganismes dans le sol. Selon la composition phylogénétique des communautés, l'effet inhibiteur vis-à-vis de *L. monocytogenes* pourrait être plus ou moins prononcé. Au sein des communautés, les interactions sont complexes et des phénomènes d'antibiose peuvent se développer. Par exemple, il a récemment été montré que la présence des genres *Prevotella* et *Janthinobacterium* dans les microbiotes colonisateurs des canalisations limitent la présence de *L. monocytogenes* alors que les genres *Enterococcus* et *Rhodococcus* sont abondamment représentés lorsque *L. monocytogenes* est détecté dans les canalisations (Fox *et al.*, 2014). Par ailleurs, certains systèmes PTS sont la cible de bactériocines (Kjos *et al.*, 2010). Ainsi, en bloquant les systèmes de transport des sources carbonées des cellules voisines, les microorganismes pourraient préserver leurs ressources. L'assimilation des sources carbonées (diversité des ressources utilisées et vitesse d'assimilation) peut également varier suivant les espèces présentes dans les communautés, laissant un accès aux nutriments plus ou moins important pour *L. monocytogenes*. De la même façon, l'abondance en prédateurs (tels que les protozoaires, bactériophages...) des communautés pourrait varier d'un sol à un autre, ce qui modifierait l'impact des

communautés sur la survie de *L. monocytogenes*. A l'inverse, certaines communautés pourraient être plus favorables à la survie de *L. monocytogenes*. Un effet synergique entre l'amibe *Tetrahymena pyriformis* et *L. monocytogenes* a été observé. En présence de l'amibe, les populations de *L. monocytogenes* se maintiennent (Ly & Muller, 1990, Gourabathini *et al.*, 2008). Pour approfondir les connaissances sur les possibles interactions biotiques entre les microorganismes telluriques et *L. monocytogenes*, et ainsi de mieux comprendre l'histoire naturelle de cette espèce bactérienne, plusieurs approches peuvent être envisagées. Il serait intéressant de caractériser la diversité et la composition des communautés des 10 sols utilisés dans ce projet pour lesquels la dynamique des populations de *L. monocytogenes* est connue et ainsi de comparer la composition des communautés et l'effet barrière associé. Les bactéries sont les représentants majoritaires du sol mais le sol héberge d'autres microorganismes. Nous pourrions donc élargir l'étude en ciblant des marqueurs phylogénétiques spécifiques aux eumycètes, aux archées ou bien encore aux représentants de la microfaune (amibes, ciliés, flagellés et nématodes). Des amorces PCR ont notamment été conçues pour amplifier, à partir du sol, le gène de l'ARNr 18S du phylum *Ciliophora* (phylum taxonomique le plus représenté chez les ciliés) (Puitika *et al.*, 2007) et des familles *Didymiaceae* et *Physaraceae* (familles majeures de l'ordre *Physarales* représentatif des amibes) (Kamono *et al.*, 2009). Ainsi, nous pourrions établir une corrélation entre la présence ou l'absence de ces microorganismes et la survie de *L. monocytogenes*, ce qui permettrait de poser des hypothèses quant à leurs impacts sur la survie de la bactérie. Il serait également intéressant de construire différents assemblages d'isolats telluriques bactériens et fongiques et de tester leur impact sur les populations de *L. monocytogenes* dans le sol. Ces approches permettraient de confirmer que certains microbiotes développent un effet barrière vis-à-vis de *L. monocytogenes* plus important que d'autres et d'établir d'éventuelles corrélations entre la composition phylogénétique et l'effet barrière. Pour apporter des éléments de réponse sur les origines de l'effet barrière qui pourraient par exemple être la résultante de l'activité métabolique de l'ensemble des microorganismes des communautés et/ou l'action d'individus en particulier, il apparaît nécessaire de développer des approches fonctionnelles. L'analyse du transcriptome global des communautés telluriques permettrait d'évaluer leurs activités et d'émettre des hypothèses sur les mécanismes d'inhibition de *L. monocytogenes* mis en jeu. Des études métabolomiques seraient nécessaires pour nous apporter des informations sur l'activité des microorganismes et les métabolites produits. Ainsi, nous pourrions corréler des activités métaboliques à la dynamique de *L. monocytogenes*. La métabolomique utilise la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire. Il est difficile d'envisager ces techniques dans une matrice

aussi complexe que le sol mais, nous pourrions utiliser de l'extrait de sol. Cette matrice présente l'avantage d'être liquide (donc filtrable) et de contenir la majorité des métabolites produits par les microorganismes telluriques.

De façon plus générale, nos résultats établissant le lien entre la diversité et la composition phylogénétique des communautés et la limitation des invasions biologiques à l'échelle microbienne sont en accord avec les théories actuelles de l'invasion biologique des communautés végétales et animales qui mettent en avant une corrélation entre le degré de diversité et la protection des écosystèmes vis-à-vis des espèces invasives (Elton, 1958). Cette universalité des principes rappelle que les principes écologiques sont nécessaires pour répondre aux questions que soulèvent l'écologie microbienne et que les modèles microbiens, de part l'échelle temps/espace plus court, sont utiles pour tester de façon expérimentale les théories d'écologie.

La persistance de *L. monocytogenes* dans le sol repose sur des facteurs intrinsèques permettant de s'adapter aux caractéristiques de l'environnement ainsi qu'à la pression biotique. Les régulateurs transcriptionnels jouent un rôle important dans l'adaptation des bactéries. Ils permettent, en fonction des fluctuations des conditions environnementales, la modulation du transcriptome des bactéries (Browning & Busby, 2004).

De plus, les comportements coopératifs tels que la virulence, la mobilité, la formation de biofilm, la production d'antibiotiques ou bien encore la compétence, induits par les systèmes de communication permettent une meilleure adaptabilité des populations bactériennes (Henke & Bassler, 2004, Keller & Surette, 2006, Hibbing *et al.*, 2010). Parmi les régulateurs transcriptionnels de *L. monocytogenes*, AgrA est un régulateur transcriptionnel qui a également pour fonction de réguler le système Agr en réponse à la détection de molécules signal. Ainsi, dans nos études, nous avons cherché à déterminer le rôle du système de communication Agr dans l'adaptation de *L. monocytogenes* au sol et si la capacité d'échanger et de répondre à des molécules signal favorise la survie de la bactérie. L'étude du système Agr permet d'aborder la dimension sociomicrobiologique de la vie de *L. monocytogenes* dans l'environnement tellurique. Nous avons étudié la dynamique et la compétitivité de mutants des mutants $\Delta agrA$ et $\Delta agrD$ affectés respectivement dans leur capacité à répondre au signal et à produire ce signal.

Nos travaux montrent qu'en microcosmes de sol, lorsqu'une croissance de *L. monocytogenes* est observée, l'inactivation du système Agr n'affecte pas la dynamique de croissance de la bactérie. A l'inverse, dans les sols où les populations de *L. monocytogenes*

diminuent au cours du temps, l'altération du système de communication Agr limite la survie de *L. monocytogenes* dans le sol. Ceci laisse présumer que dans la majorité des conditions environnementales testées, le système Agr est essentiel et le rôle des fonctions régulées par le régulateur AgrA est prédominant pour l'adaptation de la bactérie. Une analyse transcriptomique a permis de préciser l'impact de la délétion du régulateur AgrA sur la transcription des gènes du génome de *L. monocytogenes*, en absence et en présence du microbiote tellurique. Les analyses différentielles réalisées sur un sol indiquent que les différences d'expression des gènes entre la souche parentale et la souche mutante ($\Delta agrA$) sont limitées dans l'extrait de sol stérilisé. En revanche, dans un contexte biotique, une forte variation de l'expression des gènes est observée entre la souche parentale et la souche mutante. Ainsi, alors que pour répondre aux variations des conditions de l'environnement tellurique *L. monocytogenes* EGD-e est capable d'adapter sa physiologie en modifiant l'expression des gènes, cette capacité semble réduite chez la souche mutante $\Delta agrA$. Parmi les variations observées entre les deux souches, les gènes impliqués dans les processus cellulaires et notamment dans les processus liés à la paroi cellulaire, au transport, aux protéines de surface et à la compétence de la bactérie ont été identifiés. Ceci inclut un nombre significatif de systèmes PTS et de transporteurs ABC dédiés à l'assimilation des sources carbonées. La capacité à utiliser les glucides (cellobiose, maltose, β -glucosides et fructose) et à synthétiser les enzymes spécifiques pour le catabolisme de polymères complexes présents dans le sol (chitine et dérivés de cellulose) est importante pour la survie des bactéries dans l'environnement tellurique où la disponibilité en nutriments peut être faible et sujette à compétition. La faculté de *L. monocytogenes* à acquérir et utiliser ces sources énergétiques pourrait être critique pour sa vie saprophyte dans le sol comme le suggère la forte modification de la transcription de la majorité des gènes codant des systèmes PTS (22 sur 29) de chitinases et de β -glucosidases après son introduction dans de l'extrait de sol (Piveteau *et al.*, 2011). La faible survie de la souche mutante ($\Delta agrA$) dans le sol pourrait s'expliquer par son incapacité à rivaliser avec les microorganismes telluriques pour accéder aux nutriments nécessaires à sa survie. De la même façon, la modification de la paroi cellulaire est nécessaire à l'adaptation de *L. monocytogenes* à la vie saprophyte et intracellulaire (van der Veen *et al.*, 2007, Hain *et al.*, 2008, Camejo *et al.*, 2009, Toledo-Arana *et al.*, 2009, Piveteau *et al.*, 2011). Ainsi, la délétion d'*agrA* pourrait limiter l'ajustement de la paroi cellulaire en fonction de l'environnement. De façon intéressante, la transcription des gènes codant des protéines impliquées dans la résistance aux peptides antimicrobiens est également affectée par la délétion d'*agrA*. L'inactivation du système Agr pourrait donc affecter la capacité de

L. monocytogenes à résister à des phénomènes d'antibiose liés à la microflore tellurique. Enfin, de façon intéressante, des gènes de la catégorie fonctionnelle « compétence » ont été identifiés. Malgré la présence de gènes de compétence dans le génome de *L. monocytogenes*, aucun article publié n'a pu mettre en évidence un état de compétence chez la bactérie, suggérant que ces protéines pourraient être impliquées dans d'autres fonctions. Il est à noter que dans le génome de *L. monocytogenes* EGD-e, l'orthologue de *comK* est interrompu par l'intégration d'un phage (Borezee *et al.*, 2000)

Les bactéries utilisent les systèmes de communication pour contrôler la production de « biens publics », facteurs extracellulaires qui peuvent être utilisés par l'ensemble des individus (Henke & Bassler, 2004, Keller & Surette, 2006, Hibbing *et al.*, 2010) mais également de « biens privés » comme par exemple des enzymes qui ne sont pas partagés par les individus (Dandekar *et al.*, 2012, Darch *et al.*, 2012). Les systèmes de communication cellulaire peuvent donc réguler des « biens publics » (protéines extracellulaires) et/ou des « biens privés » (enzymes cellulaires). Dans le cas de *L. monocytogenes*, les fonctions régulées par le système Agr qui permettent une meilleure survie de la bactérie dans le sol pourraient être des « biens publics », comme par exemple les chitinases, ou des « biens privés », comme les transporteurs PTS. Les résultats obtenus après co-inoculation de la souche parentale et de la souche mutante $\Delta agrA$ dans des microcosmes de sol stérilisé et biotique indiquent que la compétitivité des deux souches n'est statistiquement pas différente dans le sol stérilisé alors que dans le sol biotique, la compétitivité de la souche parentale est significativement plus importante que celle de la souche mutante. Lorsque les souches sont en présence de microorganismes, la réponse Agr est importante et favorise la compétitivité de *L. monocytogenes*. Les résultats obtenus avec la souche mutante $\Delta agrD$, défectueuse dans la production de molécules signal apportent des informations supplémentaires. En effet, sa dynamique de croissance dans les sols stérilisés et sa survie en sols biotiques sont similaires à la souche mutante $\Delta agrA$ que ce soit au cours de cultures pures ou après co-inoculation des deux mutants. Ces résultats peuvent s'expliquer par la non fonctionnalité du système Agr. En revanche, la compétitivité de la souche mutante $\Delta agrD$ est accrue par la présence de la souche parentale, lorsque les deux souches sont co-inoculées dans les microcosmes de sol biotique. La souche parentale semble apporter un bénéfice à la souche mutante $\Delta agrD$ mais pas au mutant $\Delta agrA$. La souche mutante $\Delta agrD$ qui ne produit pas de molécules signal a en revanche le potentiel pour détecter et utiliser les molécules signal présentes dans l'environnement à l'inverse du mutant $\Delta agrA$ pour lequel le système Agr ne peut pas être

activé, même en présence de signal. Ainsi, l'augmentation de la compétitivité de la souche mutante *ΔagrD* observée en co-culture avec la souche parentale semble liée à la perception des molécules signal produites par la souche parentale, ce qui activerait et induirait une réponse du système de communication Agr. L'ensemble de ces résultats indique que la survie des souches est améliorée par la réponse Agr qui exerce un contrôle intrinsèque de la cellule (contrôle de bien privées). Les différences de résultats obtenus entre les deux mutants suggèrent que, dans notre dispositif expérimental, le système Agr n'intervient pas dans le contrôle des gènes codant des biens publics, accessibles à l'ensemble des cellules. Dans le cas contraire, le mutant *ΔagrA* tout comme le mutant *ΔagrD* aurait dû être favorisé par la co-culture avec la souche parentale. Le bénéfice que les biens publics extracellulaires apportent à l'ensemble de la population est d'autant plus important que la densité cellulaire est élevée alors que celui des biens privés est indépendant de la densité cellulaire (Darch *et al.*, 2012). Ainsi, dans le sol où la densité cellulaire pourrait être localement faible, le système de communication Agr pourrait apporter un avantage à *L. monocytogenes* en régulant des biens privés. Savoir si le système Agr régule uniquement des biens privés ou s'il participe à la régulation de biens publics dans certaines conditions environnementales reste une question ouverte. De manière plus générale, il serait intéressant de définir si la fonction des systèmes de communication dépend de l'environnement ou au contraire si la fonction diffère en fonction du taxon. A l'heure actuelle, il est difficile de répondre à cette question car même si des rôles différents ont été décrits selon l'organisme (Redfield, 2002), les conditions environnementales utilisées dans chaque étude diffèrent ce qui rend la comparaison difficile. Il serait donc nécessaire de concevoir des études faisant varier un seul paramètre à la fois. Nous pourrions envisager d'évaluer les fonctions biologiques régulées par le système Agr de *L. monocytogenes* dans d'autres environnements que le sol, et/ou à l'inverse, conserver notre matrice sol et tester d'autres modèles bactériens comme *P. aeruginosa* et *S. aureus*, modèles bactériens pour qui les systèmes de communication ont été largement étudiés.

Nos travaux apportent donc des informations sur le rôle social du système Agr. Ils montrent également que le quorum nécessaire à la production d'une quantité de signal suffisante pour sa détection et pour l'activation du système Agr est atteint dans le sol. Ceci suggère que, localement, la densité cellulaire et les facteurs environnementaux sont favorables à l'accumulation des molécules signal. Le seuil minimum du quorum est dépendant des propriétés de l'environnement tels que la disponibilité en eau et le transfert de masse (Dulla & Lindow, 2008) et de la distribution spatiale des cellules (Hense *et al.*, 2007). Dans des conditions spécifiques où la diffusion des molécules signal est restreinte, le seuil minimum

peut être atteint avec une population contenant peu d'individus. Par exemple, chez *Pseudomonas syringae*, sur une surface foliaire, seulement une dizaine de cellules en amas sont nécessaires pour atteindre le quorum (Dulla & Lindow, 2008). Il serait intéressant de développer des approches basées sur l'individu afin de prendre en considération le microenvironnement dans lequel se trouve la cellule. En effet, à cette échelle de nombreuses questions restent sans réponse. A quelle distance de la cellule productrice les molécules signal sont-elles émises et quelle est la distance maximale de détection? Quelle est la durée de vie des molécules signal? Sont-elles sujettes à la dégradation? Toutes ces informations seraient nécessaires pour définir les conditions favorables à l'accumulation des molécules signal et à l'induction du système Agr dans le sol. Une étude décrit par exemple que les acyl-HSL peuvent être dégradées et utilisées comme source de carbone par une souche isolée du sol, *Pseudomonas* PAI-A (Huang *et al.*, 2003) alors que les acyl-HSL sont stables plusieurs semaines à faible pH ($5 < \text{pH} < 6$) (Schaefer *et al.*, 2000). Pour obtenir des informations similaires, il serait nécessaire d'extraire, de purifier et de caractériser les peptides produits par *L. monocytogenes*.

Un autre aspect de la sociomicrobiologie peut être abordé grâce à cette étude. En utilisant les molécules signal sans participer à leur production, la souche mutante ΔagrD pourrait défavoriser la survie de la souche parentale. En théorie, dans une population constituée d'organismes sociaux, les individus qui communiquent et coopèrent peuvent être exploités par des individus dits « tricheurs » (Hamilton, 1964, Lehmann & Keller, 2006). Les tricheurs peuvent être avantagés et prospérer au détriment de la population en économisant les coûts métaboliques liés à la production des molécules de signalisation, à leur détection ou à la production d'exo-produits (Diggle *et al.*, 2007b). De tels tricheurs ont été isolés de populations de *Myxococcus xanthus* lors de la formation de corps de fructification (Velicer *et al.*, 2000), de *Saccharomyces cerevisiae* où les sucres hydrolysés peuvent être détournés par des cellules qui ne participent pas à leur hydrolyse (Greig & Travisano, 2004) ou bien encore de *P. aeruginosa* (Denervaud *et al.*, 2004, Schaber *et al.*, 2004). Dans les communautés de *P. aeruginosa*, les tricheurs sont des mutants spontanés au système de communication Las non fonctionnel, avec une prédominance de souches incapables de détecter les molécules signal. En théorie, les mutants du type ΔagrA devraient être nettement favorisés, ce qui ne semble pas être le cas dans les microcosmes de sol testés. Parmi les isolats de *L. monocytogenes* d'origine environnementale ou clinique décrits à ce jour, aucune mutation du système Agr n'a été rapporté et aucun tricheur n'a été identifié. Les mutants tricheurs du

modèle bactérien *P. aeruginosa* sont isolés dans la majorité des cas dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose (Sandoz *et al.*, 2007). Dans cet environnement confiné où la diffusion des molécules signal est faible du fait de la viscosité de la matrice, où le microbiote indigène est moins abondant que par exemple dans les intestins ou le sol, *P. aeruginosa* peut se développer sur une longue période (Jiricny *et al.*, 2014). Cet environnement particulier favorise donc l'apparition de tricheurs. Les environnements où *L. monocytogenes* est détectée seraient moins favorables à l'apparition spontanée d'individus tricheurs et la régulation par Agr de « biens privés » serait un facteur limitant leur apparition comme le suggère Dandekar pour *Pseudomonas* (Dandekar *et al.*, 2012). Pour étudier de façon plus approfondie la question de l'émergence de tricheurs au sein des populations de *L. monocytogenes*, il serait nécessaire de réaliser des expériences de co-cultures en variant les ratios initiaux souche mutante/souche parentale (1/99, 5/95 ou 10/90). Comme montré par Diggle *et al.*, si les mutants sont des tricheurs, leur proportion devrait augmenter au cours du temps au détriment de la souche parentale (Diggle *et al.*, 2007b). D'autres environnements pourraient également être testés car, dans le sol, la prépondérance des « biens privés » pourrait être défavorable à l'apparition de tricheurs.

De plus, comme expliqué dans l'introduction bibliographique, l'expression du système Agr est hétérogène et des sous-populations existent au sein des communautés de *L. monocytogenes*. L'hétérogénéité intra-clonale pourrait permettre le contrôle des tricheurs. En effet, lorsque la proportion de tricheurs est trop importante au sein des populations, le système n'est plus viable et une diminution des individus tricheurs est observée (Sandoz *et al.*, 2007). En possédant une sous-population qui n'exprime pas le système Agr, l'apparition des tricheurs pourrait être limitée. Le caractère hétérogène de l'expression du système Agr pourrait donc être favorable à la stabilité et la performance de la bactérie. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions évaluer la capacité de survie d'une population dont la majorité des cellules exprime le système Agr. Des travaux menés au sein de notre équipe ont mis en évidence que la délétion de la partie intergénique de l'opéron Agr entraîne une perte d'hétérogénéité des populations de *L. monocytogenes*. Ainsi, par l'étude de ces populations, nous pourrions déterminer si la perte d'hétérogénéité améliore ou défavorise la survie de *L. monocytogenes*. De plus, l'hétérogénéité du système Agr a été observée pour des souches de *L. monocytogenes* cultivées dans les conditions de laboratoire. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'hétérogénéité du système Agr est générique à l'espèce quelles que soient les conditions environnementales (sol, eau, surface abiotique, intestin...) et les caractéristiques génomiques (lignée I, II et III) de la bactérie.

Pour finir, nos travaux ont permis de montrer que l'expression d'une partie du génome non codé de *L. monocytogenes* varie significativement entre la souche parentale et la souche mutante $\Delta agrA$. A l'heure actuelle, 271 ARNnc ont été identifiés dans le génome de *L. monocytogenes* (Mandin *et al.*, 2007, Mraheil *et al.*, 2011, Mellin & Cossart, 2012, Wurtzel *et al.*, 2012). Cette part non codée du génome contribue à la régulation de la virulence, des voies métaboliques et de l'adhésion de *L. monocytogenes* (Mandin *et al.*, 2007, Toledo-Arana *et al.*, 2009, Mraheil *et al.*, 2011). Les variations de transcription des ARNnc observées entre les deux souches semblent indiquer que le régulateur AgrA joue un rôle dans leur régulation. Ainsi, en délétant le gène codant le régulateur AgrA, une dérégulation des fonctions biologiques contrôlées par des ARNnc pourrait avoir lieu et pourrait expliquer la faible survie de la souche mutante dans les microcosmes de sol biotique. Les approches transcriptomiques de ce projet nous ont permis d'évaluer les variations des taux de transcrits dans des conditions données. La réponse des populations de *L. monocytogenes* dépend du sol considéré ce qui suggère que la réponse transcriptomique de la bactérie diffère selon le sol et que les communautés fonctionnelles du sol jouent un rôle dans la modification de cette réponse. De ce fait, il serait intéressant de comparer le transcriptome de *L. monocytogenes* dans les 10 sols pour lesquels la dynamique des populations est connue. Des études complémentaires de génétiques inversées pourraient également apporter des indications sur la fonction des gènes et des ARNnc identifiés lors des études de transcriptomique. Par exemple, le gène *lmo0349* (la fonction de la protéine codée est à l'heure actuelle non définie) fait partie des gènes hautement exprimés ($> 9 \log$) dont le taux de transcrit varie fortement entre la souche parentale et la souche mutante $\Delta agrA$ (Fold-change de 21,4) (Tableau S4 du Chapitre 1). La construction d'un mutant de délétion de ce gène et sa caractérisation permettraient d'apporter des informations complémentaires en vérifiant son importance dans l'adaptation de *L. monocytogenes* au sol.

L'ensemble des travaux de ce projet ont été menés avec la souche de laboratoire *L. monocytogenes* EGD-e. Pour confirmer le caractère générique de ces observations à l'espèce, il serait primordial d'étudier la dynamique de souches environnementales et cliniques représentatives de la diversité génotypique de l'espèce. D'autres matrices pourraient également être testées pour vérifier par exemple si l'effet barrière de la microflore contre l'invasion de *L. monocytogenes* est effectif quel que soit l'environnement ou bien encore si la fonction du système Agr dépend de l'environnement considéré. Des études indiquent que la perturbation du microbiote intestinal de l'Homme entraîne une diminution de résistance face

aux pathogènes et augmente le risque d'infections entériques (Sekirov & Finlay, 2009). L'invasion de la rhizosphère par *P. aeruginosa* (Matos *et al.*, 2005) et le compost par *E. coli* 0157:H7 (Kim *et al.*, 2011) s'est vue limitée lorsque les environnements étaient microbiologiquement diversifiés, indiquant que l'impact de la diversité microbienne sur l'invasion d'espèces bactériennes pourrait avoir un caractère générique. Nous pouvons donc nous interroger sur le rôle de la diversité et de la composition du microbiote intestinal quant à l'invasion et l'infection de *L. monocytogenes*.

Enfin, le suivi de la dynamique des populations est basé sur la cultivabilité. Nous ne pouvons donc pas écarter l'hypothèse que la décroissance observée est due au passage à l'état viable non cultivable (VNC) des bactéries. L'état VNC est une stratégie qui permet aux cellules de survivre dans des conditions non favorables, ce qui pourrait être le cas dans le sol, lorsque les nutriments sont limités ou lorsque la bactérie est la cible de bactériocines. Les bactéries à l'état VNC perdent leur capacité à se multiplier sur les milieux de culture conventionnellement utilisés aux laboratoires mais possèdent une activité métabolique et cet état est réversible. La difficulté pour identifier ce genre de bactéries dans nos études est la nature même de notre matrice. Les techniques de recherche et de numération des bactéries VNC sont basées sur la fluorimétrie et implique l'utilisation de la microscopie et de la cytométrie en flux, ce qui n'est pas compatible avec le sol. L'utilisation de la qPCR permet également l'étude des bactéries à l'état VNC mais la sensibilité de la méthode peut être limitante (au minimum 10^4 UFC sont nécessaires).

En conclusion, le système de communication Agr intervient dans un réseau de régulation complexe et joue un rôle crucial dans l'adaptation, la survie et la compétitivité de *L. monocytogenes* dans le sol. Par l'intermédiaire du régulateur AgrA, le système Agr permet une modification du transcriptome et probablement du métabolisme de la bactérie en réponse aux stimuli environnementaux. Malgré ces processus d'adaptation, le microbiote indigène du sol limite la survie de *L. monocytogenes* en agissant comme une barrière biologique, cette barrière étant d'autant plus forte que la diversité du microbiote tellurique est importante.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P., *et al.* (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 43: 1-14.
- Abee, T., Kovacs, A.K.T., Kuipers, O.P., Van Der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 172-179.
- Agaisse, H., Gominet, M., Okstad, O.A., Kolsto, A.B., Lereclus, D. (1999). PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 32: 1043-1053.
- Akya, A., Pointon, A., Thomas, C. (2009). Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70: 20-29.
- Akya, A., Pointon, A., Thomas, C. (2010). *Listeria monocytogenes* does not survive ingestion by *Acanthamoeba polyphaga*. *Microbiol-UK* 156: 809-818.
- Alam, S.I., Kamran, M., Sohail, M., Ahmad, A., Khan, S.A. (2011). Partial characterization of bacteriocin like inhibitory substance from *Bacillus subtilis* BS15, a local soil isolate. *Pak. J. Bot.* 43: 2195-2199.
- Allan, E., Weisser, W., Weigelt, A., Roscher, C., Fischer, M., Hillebrand, H. (2011). More diverse plant communities have higher functioning over time due to turnover in complementary dominant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 17034-17039.
- Anderson, G.L., Kenney, S.J., Millner, P.D., Beuchat, L.R., Williams, P.L. (2006). Shedding of foodborne pathogens by *Caenorhabditis elegans* in compost-amended and unamended soil. *Food Microbiol.* 23: 146-153.
- Anetzberger, C., Pirch, T., Jung, K. (2009). Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* 73: 267-277.
- Arous, S., Buchrieser, C., Folio, P., Glaser, P., Namane, A., Hebraud, M., *et al.* (2004). Global analysis of gene expression in an *rpoN* mutant of *Listeria monocytogenes*. *Microbiol-UK* 150: 1581-1590.
- Arrouays, D., Jolivet, C., Boulonne, L., Bodineau, G., Saby, N., Grolleau, E. (2002). A new initiative in France: a multi-institutional soil quality monitoring network. *Comptes rendus de l'Academie d'Agriculture de France* 88: 93-103.
- Atkinson, S., Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface* 6: 959-978.
- Auguet, J.C., Barberan, A., Casamayor, E.O. (2010). Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME J.* 4: 182-190.
- Autio, T., Lyytikäinen, O., Maija, H., Riitta, M. (1999). An outbreak of listeriosis due to *Listeria monocytogenes* serotype 3a from butter in Finland. *Eurosurveillance* 3.

- Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P., Charbit, A. (2003). Identification of the agr locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect. Immun.* 71: 4463-4471.
- Bates, S.T., Clemente, J.C., Flores, G.E., Walters, W.A., Parfrey, L.W., Knight, R., *et al.* (2013). Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil. *ISME J.* 7: 652-659.
- Baumann, K., Dignac, M.F., Rumpel, C., Bardoux, G., Sarr, A., Steffens, M., *et al.* (2012). Soil microbial diversity affects soil organic matter decomposition in a silty grassland soil. *Biogeochemistry* 114: 201-212.
- Becker, L.A., Cetin, M.S., Hutkins, R.W., Benson, A.K. (1998). Identification of the gene encoding the alternative Sigma factor Sigma B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J. Bacteriol.* 180: 4547-4554.
- Becker, L.A., Evans, S.N., Hutkins, R.W., Benson, A.K. (2000). Role of Sigma B in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J. Bacteriol.* 182: 7083-7087.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2002). Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6005-6012.
- Begley, M., Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2005). Contribution of three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *btlB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 73: 894-904.
- Behari, J., Youngman, P. (1998a). Regulation of hly expression in *Listeria monocytogenes* by carbon sources and pH occurs through separate mechanisms mediated by PrfA. *Infect Immun* 66: 3635-3642.
- Behari, J., Youngman, P. (1998b). A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J. Bacteriol.* 180: 6316-6324.
- Behrens, S., Widder, S., Mannala, G.K., Qing, X., Madhugiri, R., Kefer, N., *et al.* (2014). Ultra deep sequencing of *Listeria monocytogenes* sRNA transcriptome revealed new antisense RNAs. *PLoS ONE* 9: e83979. doi:83910.81371/journal.pone.0083979.
- Bennett, H.J., Pearce, D.M., Glenn, S., Taylor, C.M., Kuhn, M., Sonenshein, A.L., *et al.* (2007). Characterization of *relA* and *codY* mutants of *Listeria monocytogenes*: identification of the CodY regulon and its role in virulence. *Mol. Microbiol.* 63: 1453-1467.
- Beresford, M.R., Andrew, P.W., Shama, G. (2001). *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *J. Appl. Microbiol.* 90: 1000-1005.
- Bernagozzi, M., Bianucci, F., Sacchetti, R., Bisbini, P. (1994). Study of the prevalence of *Listeria* spp in surface-water. *ZBL Hyg. Umweltmed.* 196: 237-244.

- Bertrand, J.C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P. (2011) Adaptations des procaryotes à leurs biotopes et aux conditions physico-chimiques dans les milieux naturels ou anthropisés In *Ecologie microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Pau: Presses universitaires de Pau et des pays de l'Adour, pp. 297-362.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M.R., Haug, M.C., Lawson, P.A., Lacroix, C., *et al.* (2013). *Listeria fleischmannii* sp nov., isolated from cheese. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 63: 526-532.
- Beuchat, L.R. (1996). *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control* 7: 223-228.
- Bigwood, T., Hudson, J.A., Cooney, J., McIntyre, L., Billington, C., Heinemann, J.A., *et al.* (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus mundtii* isolated from soil. *Food Microbiol.* 32: 354-360.
- Bille, J., Blanc, D., Schmid, H., Boubaker, K., Baumgartner, A., Siegrist, H., *et al.* (2006). Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. *Eurosurveillance* 11.
- Boerlin, P., BoerlinPetzold, F., Bannerman, E., Bille, J., Jemmi, T. (1997). Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1338-1343.
- Boles, B.R., Horswill, A.R. (2008). agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 4.
- Bonazzi, M., Veiga, E., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P. (2008). Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology* 10: 2208-2222.
- Bonazzi, M., Vasudevan, L., Mallet, A., Sachse, M., Sartori, A., Prevost, M.C., *et al.* (2011). Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization. *Journal of Cell Biology* 195: 525-536.
- Bouttefroy, A., Lemaitre, J.P., Rousset, A. (1997). Prevalence of *Listeria* sp in droppings from urban rooks (*Corvus frugilegus*). *J. Appl. Microbiol.* 82: 641-647.
- Bowden, S.D., Hale, N., Chung, J.C.S., Hodgkinson, J.T., Spring, D.R., Welch, M. (2013). Surface swarming motility by *Pectobacterium atrosepticum* is a latent phenotype that requires O antigen and is regulated by quorum sensing. *Microbiol-UK* 159: 2375-2385.
- Brandl, M.T. (2006) Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. In *Annual Review of Phytopathology*. Palo Alto: Annual Reviews, pp. 367-392.
- Brehm, K., Ripio, M.T., Kreft, J., Vazquez-Boland, J.A. (1999). The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides. *J. Bacteriol.* 181: 5024-5032.

- Brondsted, L., Kallipolitis, B.H., Ingmer, H., Knochel, S. (2003). kdpE and a putative RsbQ homologue contribute to growth of *Listeria monocytogenes* at high osmolarity and low temperature. FEMS Microbiol. Lett. 219: 233-239.
- Browning, D.F., Busby, S.J.W. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. Nat. Rev. Microbiol. 2: 57-65.
- Büla, C.J., Bille, J., Glauser, M.P. (1995). An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. Clin. Infect. Dis. 20: 66-72.
- Cain, D.B., McCann, V.L. (1986). An unusual case of cutaneous listeriosis. J. Clin. Microbiol. 23: 976-977.
- Caldwell, K.N., Anderson, G.L., Williams, P.L., Beuchat, L.R. (2003). Attraction of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, to foodborne pathogenic bacteria and its potential as a vector of *Salmonella poona* for preharvest contamination of cantaloupe. J. Food Protect. 66: 1964-1971.
- Camejo, A., Buchrieser, C., Couvé, E., Carvalho, F., Reis, O., Ferreira, P., *et al.* (2009). *In vivo* transcriptional profiling of *Listeria monocytogenes* and mutagenesis identify new virulence factors involved in infection. PLoS Pathog. 5: e1000449. doi:1000410.1001371/journal.ppat.1000449.
- Campbell, E.A., Westblade, L.F., Darst, S.A. (2008). Regulation of bacterial RNA polymerase Sigma factor activity: a structural perspective. Curr. Opin. Microbiol. 11: 121-127.
- Cao, P., Zhang, L.M., Shen, J.P., Zheng, Y.M., Di, H.J., He, J.Z. (2012). Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. FEMS Microbiol. Ecol. 80: 146-158.
- Castanie-Cornet, M.P., Treffandier, H., Francez-Charlot, A., Gutierrez, C., Cam, K. (2007). The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF. Microbiol-UK 153: 238-246.
- Cetin, M.S., Zhang, C., Hutkins, R.W., Benson, A.K. (2004). Regulation of transcription of compatible solute transporters by the general stress sigma factor (B) in *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 186: 794-802.
- Chakraborty, T., Hain, T., Domann, E. (2000). Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. Int. J. Med. Microbiol. 290: 167-174.
- Challan Belval, S., Gal, L., Margiewes, S., Garmyn, D., Piveteau, P., Guzzo, J. (2006). Assessment of the roles of LuxS, S-ribosyl momocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2644-2650.
- Chan, Y.C., Hu, Y.W., Chaturongakul, S., Files, K.D., Bowen, B.M., Boor, K.J., *et al.* (2008a). Contributions of two-component regulatory systems, alternative sigma factors, and negative regulators to *Listeria monocytogenes* cold adaptation and cold growth. Journal of Food Protection 71: 420-425.

- Chan, Y.C., Hu, Y.W., Chaturongakul, S., Files, K.D., Bowen, B.M., Boor, K.J., *et al.* (2008b). Contributions of two-component regulatory systems, alternative Sigma factors, and negative regulators to *Listeria monocytogenes* cold adaptation and cold growth. *J. Food Protect.* 71: 420-425.
- Chaturongakul, S., Boor, K.J. (2006). Sigma B activation under environmental and energy stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5197-5203.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Palmer, M.E., Bergholz, T.M., Orsi, R.H., Hu, Y.W., *et al.* (2011a). Transcriptomic and phenotypic analyses identify coregulated, overlapping regulons among PrfA, CtsR, HrcA, and the alternative sigma factors sigma(B), sigma(C), sigma(H), and sigma(L) in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 77: 187-200.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Palmer, M.E., Bergholz, T.M., Orsi, R.H., Hu, Y.W., *et al.* (2011b). Transcriptomic and phenotypic analyses identify coregulated, overlapping regulons among PrfA, CtsR, HrcA, and the alternative Sigma factors Sigma B, Sigma C, Sigma H, and Sigma L in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 187-200.
- Chaudhuri, S., Bruno, J.C., Alonzo, F., Xayarath, B., Cianciotto, N.P., Freitag, N.E. (2010). Contribution of chitinases to *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7302-7305.
- Chen, J., McClane, B.A. (2012). Role of the Agr-like quorum-sensing system in regulating toxin production by *Clostridium perfringens* type B strains CN1793 and CN1795. *Infect. Immun.* 80: 3008-3017.
- Chevalier, C., Boisset, S., Romilly, C., Masquida, B., Fechter, P., Geissmann, T., *et al.* (2010). *Staphylococcus aureus* RNAIII binds to two distant regions of *coa* mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog.* 6: e1000809. doi:1000810.1001371/journal.ppat.1000809.
- Chico-Calero, I., Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scortti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., *et al.* (2002). Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 431-436.
- Chowdhury, R., Sahu, G.K., Das, J. (1996). Stress response in pathogenic bacteria. *Journal of Biosciences* 21: 149-160.
- Christiansen, J.K., Nielsen, J.S., Ebersbach, T., Valentin-Hansen, P., Søgaaard-Andersen, L., Kallipolitis, B.H. (2006). Identification of small Hfq-binding RNAs in *Listeria monocytogenes*. *RNA* 12: 1383-1396.
- Chu, H.Y., Fierer, N., Lauber, C.L., Caporaso, J.G., Knight, R., Grogan, P. (2010). Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology* 12: 2998-3006.
- Collins, B., Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2012). Assessing the contributions of the LiaS histidine kinase to the innate resistance of *Listeria*

- monocytogenes* to nisin, cephalosporins, and disinfectants. Appl. Environ. Microbiol. 78: 2923-2929.
- Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D.J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., *et al.* (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse-transcriptase sequencing of 16S ribosomal-RNA. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 240-246.
- Comella, N., Grossman, A.D. (2005). Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 57: 1159-1174.
- Corbett, D., Wang, J.H., Schuler, S., Lopez-Castejon, G., Glenn, S., Brough, D., *et al.* (2012). Two zinc uptake systems contribute to the full virulence of *Listeria monocytogenes* during growth *in vitro* and *in vivo*. Infect. Immun. 80: 14-21.
- Cossart, P., Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. Microbes Infect. 10: 1041-1050.
- Cotter, P.D., Emerson, N., Gahan, C.G.M., Hill, C. (1999). Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 181: 6840-6843.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2001). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. Mol. Microbiol. 40: 465-475.
- Cotter, P.D., Guinane, C.M., Hill, C. (2002). The LisRK signal transduction system determines the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to nisin and cephalosporins. Antimicrob. Agents Ch. 46: 2784-2790.
- Cox, N.A., Bailey, J.S., Berrang, M.E. (1997). The presence of *Listeria monocytogenes* in the integrated poultry industry. Journal of Applied Poultry Research 6: 116-119.
- Cui, S.H., Meng, J.H., Bhagwat, A.A. (2001). Availability of glutamate and arginine during acid challenge determines cell density-dependent survival phenotype of *Escherichia coli* strains. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4914-4918.
- Czeszejko, K., Bogusławska-Wąs, E., Dąbrowski, W., Kaban, S., Umański, R. (2003). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in municipal and industrial sewage. Electron. J. Polish Agr. Uni. 6.
- Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A., Southwick, F.S. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. P. Natl Acad. Sci. U. S. A. 87: 6068-6072.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., The European *Listeria* Genome, C., Héchard, Y. (2001). A Sigma 54-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. Microbiology+ 147: 3263-3269.
- Dandekar, A.A., Chugani, S., Greenberg, E.P. (2012). Bacterial quorum sensing and metabolic incentives to cooperate. Science 338: 264-266.

- Darch, S.E., West, S.A., Winzer, K., Diggle, S.P. (2012). Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 8259-8263.
- Darwin, C. (1859). *The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life.*
- De Jong, I.G., Haccou, P., Kuipers, O.P. (2010). Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *BioEssays* 33: 215-223.
- de las Heras, A., Cain, R.J., Bieleckal, M.K., Vazquez-Boland, J.A. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology* 14: 118-127.
- De Luca, G., Zanetti, F., Fateh-Moghadm, P., Stampi, S. (1998). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in sewage sludge. *Zent.bl. Hyg. Umweltmed.* 201: 269-277.
- De Vos, P., Boone, D.R., Garrity, G.M. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology: volume 3: the Firmicutes.* Springer: New York, N.Y.
- Den Bakker, H., Bowen, B., Rodriguez-Rivera, L., Wiedmann, M. (2012). FSL J1-208, a virulent uncommon phylogenetic lineage IV *Listeria monocytogenes* strain with a small chromosome size and a putative virulence plasmid carrying internalin-like genes. *Appl Environ Microbiol* 78: 1876-1889.
- Den Bakker, H.C., Desjardins, C.A., Griggs, A.D., Peters, J.E., Zeng, Q., Young, S.K., *et al.* (2013). Evolutionary dynamics of the accessory genome of *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE* 8: e67511. doi:67510.61371/journal.pone.0067511.
- Denervaud, V., TuQuoc, P., Blanc, D., Favre-Bonte, S., Krishnapillai, V., Reimann, C., *et al.* (2004). Characterization of cell-to-cell signaling-deficient *Pseudomonas aeruginosa* strains colonizing intubated patients. *J. Clin. Microbiol.* 42: 554-562.
- Deng, X.Y., Phillippy, A.M., Li, Z.X., Salzberg, S.L., Zhang, W. (2010). Probing the pan-genome of *Listeria monocytogenes*: new insights into intraspecific niche expansion and genomic diversification. *BMC Genomics* 11: 21.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., *et al.* (2011). Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography* 20: 641-652.
- Diggle, S.P., Gardner, A., West, S.A., Griffin, A.S. (2007a). Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 362: 1241-1249.
- Diggle, S.P., Griffin, A.S., Campbell, G.S., West, S.A. (2007b). Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450: 411-417.
- Disson, O., Grayo, S., Huillet, E., Nikitas, G., Langa-Vives, F., Dussurget, O., *et al.* (2008). Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455: 1114-1118.

- Dmowska, K., Wieczorek, K., Lynch, O., Osek, J. (2013). Typing of *Listeria monocytogenes* isolated from slaughtered cattle and beef meat. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 57: 179-183.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. (2004a). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3819-3822.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., *et al.* (2004b). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* 72: 1072-1083.
- Dowd, G.C., Casey, P.G., Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G.M. (2012). Investigation of the role of ZurR in the physiology and pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 327: 118-125.
- Dowe, M.J., Jackson, E.D., Mori, J.G., Bell, C.R. (1997). *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *J. Food Prot.* 60: 1201-1207.
- Doyscher, D., Fieseler, L., Dons, L., Loessner, M.J., Schuppler, M. (2013). *Acanthamoeba* feature a unique backpacking strategy to trap and feed on *Listeria monocytogenes* and other motile bacteria. *Environ. Microbiol.* 15: 433-446.
- Dulla, G., Lindow, S.E. (2008). Quorum size of *Pseudomonas syringae* is small and dictated by water availability on the leaf surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 3082-3087.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., Kuske, C.R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol* 65: 1662-1669.
- Duncan, L., Losick, R. (1993). SpoIIAB is an anti-Sigma factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein Sigma F from *Bacillus subtilis*. *P. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 90: 2325-2329.
- Ebright, R.H. (1993). Transcription activation at class I CAP dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 8: 797-802.
- EFSA, ECDPC. (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11: 3129.
- Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D., Swain, P.S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 297: 1183-1186.
- Elton, C.S. (1958). *The ecology of invasions by animals and plants*, p. 196. University of Chicago Press: London.
- Faridani, O.R., Nikraves, A., Pandey, D.P., Gerdes, K., Good, L. (2006). Competitive inhibition of natural antisense Sok-RNA interactions activates Hok-mediated cell killing in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 34: 5915-5922.

- Fenlon, D. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Bacteriol.* 59: 537-543.
- Fenlon, D.R., Stewart, T., Donachie, W. (1995). The incidence, numbers and types of *Listeria monocytogenes* isolated from farm bulk tank milks. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 57-60.
- Ferreira, A., O'Byrne, C.P., Boor, K.J. (2001). Role of Sigma B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4454-4457.
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B. (2007). Toward and ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88: 1354-1364.
- Fierer, N., Lennon, J.T. (2011). The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *Am. J. Bot.* 98: 439-448.
- Flanary, P.L., Allen, R.D., Dons, L., Kathariou, S. (1999). Insertional inactivation of the *Listeria monocytogenes cheYA* operon abolishes response to oxygen gradients and reduces the number of flagella. *Can. J. Microbiol.* 45: 646-652.
- Fox, E., O'Mahony, T., Clancy, M., Dempsey, R., O'Brien, M., Jordan, K. (2009). *Listeria monocytogenes* in the Irish dairy farm environment. *J. Food Protect.* 72: 1450-1456.
- Fox, E., Hunt, K., O'Brien, M., Jordan, K. (2011). *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments. *Int. J. Food Microbiol.* 145: S39-S45.
- Fox, E.M., Solomon, K., Moore, J.E., Wall, P.G., Fanninga, S. (2014). Phylogenetic profiles of in-house microflora in drains at a food production facility: comparison and biocontrol implications of *Listeria*-positive and -negative bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 3369-3374.
- Franklin, R.B., Mills, A.L. (2006). Structural and functional responses of a sewage microbial community to dilution-induced reductions in diversity. *Microb. Ecol.* 52: 280-288.
- Fraser, K.R., Sue, D., Wiedmann, M., Boor, K., O'Byrne, C.P. (2003). Role of Sigma B in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: Osmotic induction of *opuC* is Sigma B dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2015-2022.
- Freitag, N.E., Rong, L.J., Portnoy, D.A. (1993). Regulation of the PrfA transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: Multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 61: 2537-2544.
- Freitag, N.E., Port, G.C., Miner, M.D. (2009). *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 623-628.
- Fretz, R., Sagel, U., Ruppitsch, W., Pietzka, T., Stöger, A., Huhulescu, S., *et al.* (2010). Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel', Austria and Germany 2009. *Eurosurveillance* 15.
- Fujii, T., Ingham, C., Nakayama, J., Beerthuyzen, M., Kunuki, R., Molenaar, D., *et al.* (2008). Two homologous Agr-like quorum-sensing systems cooperatively control adherence,

- cell morphology, and cell viability properties in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. J. Bacteriol. 190: 7655-7665.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. (1994). Qorum sensing in bacteria - the LuxR-LuxI family of cell density-response transcriptional regulators. J. Bacteriol. 176: 269-275.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., Koonin, E.V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. FEMS Microbiol Lett 203: 11-21.
- Gamboa-Marin, A., Buitrago, S., Perez-Perez, K., Mercado, M., Poutou-Pinales, R., Carrascal-Camacho, A. (2012). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork-meat and other processed products from the Colombian swine industry. Revista Mvz Cordoba 17: 2827-2833.
- Garcia, E., DePaz, M., Rodriguez, J.L., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M. (1996). Exogenous sources of *Listeria* contamination in raw ewe's milk. J. Food Protect. 59: 950-954.
- Garland, J.L., Lehman, R.M. (1999). Dilution/extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities. FEMS Microbiol. Ecol. 30: 333-343.
- Garmyn, D., Gal, L., Lemaitre, J.-P., Hartmann, A., Piveteau, P. (2009). Communication and autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*. Commun. Integr. Biol. 2: 371-374.
- Garmyn, D., Gal, L., Briandet, R., Guilbaud, M., Lemaitre, J.-P., Hartmann, A., *et al.* (2011). Expression of the Agr system of *Listeria monocytogenes* at the single cell level: evidence of heterogeneity in autoinduction. Appl. Environ. Microbiol. 17: AEM.02891-02810.
- Garmyn, D., Augagneur, Y., Gal, L., Vivant, A.-L., Piveteau, P. (2012). *Listeria monocytogenes* differential transcriptome analysis reveals temperature-dependent Agr regulation and suggests overlaps with other regulons. PLoS ONE 7: e43154. doi:43110.41371/journal.pone.0043154.
- Garrec, N., Picard-Bonnaud, F., Pourcher, A.M. (2003). Occurrence of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. FEMS Immunol. Med. Mic. 35: 275-283.
- Garrido, V., Vitas, A.I., Garcia-Jalon, I. (2009). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. Food Control 20: 986-991.
- Geisow, M.J., D'Arcy Hart, P., Young, M.R. (1981). Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: studies by fluorescence spectroscopy. J. Cell Biol. 89: 645-652.
- Gelbicova, T., Karpiskova, R. (2012). Outdoor environment as a source of *Listeria monocytogenes* in food chain. Czech J. Food Sci. 30: 83-88.

- Gibbs, D.S., Anderson, G.L., Beuchat, L.R., Carta, L.K., Williams, P.L. (2005). Potential role of *Diploscapter* sp strain LKC25, a bacterivorous nematode from soil, as a vector of food-borne pathogenic bacteria to preharvest fruits and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2433-2437.
- Giller, P.S. (1996). The diversity of soil communities, the 'poor man's tropical rainforest'. *Biodivers. Conserv.* 5: 135-168.
- Girardin, H., Morris, C.E., Albagnac, C., Dreux, N., Glaux, C., Nguyen-The, C. (2005). Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 287-295.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., *et al.* (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294: 849-852.
- Gobat, J.-m., Aragno, m., Matthey, w. (2010). *Le sol vivant (3ème édition)*. Presses polytechniques et universitaires romandes: Lausanne.
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Økstad, O.A., Gominet, M., *et al.* (2008). The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* 3: e2793. doi:2710.1371/journal.pone.0002793.
- Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., Lereclus, D. (2001). Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. *Mol. Microbiol.* 40: 963-975.
- González-Pastor, J.E. (2011). Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 415-424.
- Gopal, S., Berg, D., Hagen, N., Schriefer, E.M., Stoll, R., Goebel, W., *et al.* (2010). Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. *PLoS ONE* 5: e10349. doi:10310.11371/journal.pone.0010349.
- Gorski, L., Duhe, J.M., Flaherty, D. (2011). The Sigma B operon is a determinant of fitness for a *Listeria monocytogenes* serotype 4b strain in soil. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 699-704.
- Gottesman, S. (2005). Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *TRENDS Genet.* 21: 399-404.
- Gottesman, S., McCullen, C.A., Guillier, M., Vanderpool, C.K., Majdalani, N., Benhammou, J., *et al.* (2006). Small RNA regulators and the bacterial response to stress. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 71: 1-11.
- Goulet, V. (1995). Investigation of listeriosis outbreaks. *Med. Mal. Infect.* 25: 184-190.
- Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaumont, P., *et al.* (1998). Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *J. Infect. Dis.* 177: 155-160.

- Goulet, V., Leclercq, A., Vaillant, V., Le Monnier, A., Laurent, E., Thierry-Bled, F., *et al.* (2008). Recrudescence récente des cas de listériose en France. Bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS) 30-31: 268-273.
- Gourabathini, P., Brandl, M.T., Redding, K.S., Gunderson, J.H., Berk, S.G. (2008). Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. Appl. Environ. Microbiol. 74: 2518-2525.
- Gowda, K.L., John, J., Marie, M.A.M., Sangeetha, G., Bindurani, S.R. (2013). Isolation and characterization of quorum-sensing signalling molecules in *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from nosocomial infections. Apmis 121: 886-889.
- Graves, L.M., Hunter, S.B., Ong, A.R., Schoonmaker-Bopp, D., Hise, K., Kornstein, L., *et al.* (2005). Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the pulsenet network. J. Clin. Microbiol. 43: 2350-2355.
- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., *et al.* (2010). *Listeria marthii* sp nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. Int. J. Syst. Evol. Micr. 60: 1280-1288.
- Gray, M.L., Killinger, A.H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriol. Rev. 30: 309-382.
- Green, J.L., Holmes, A.J., Westoby, M., Oliver, I., Briscoe, D., Dangerfield, M., *et al.* (2004). Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. Nature 432: 747-750.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K.S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., *et al.* (1998). Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-Dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. Infect. Immun. 66: 5260-5267.
- Greig, D., Travisano, M. (2004). The Prisoner's Dilemma and polymorphism in yeast SUC genes. P. Roy. Soc. Lond. B Bio. 271: S25-S26.
- Griffin, A.S., West, S.A., Buckling, A. (2004). Cooperation and competition in pathogenic bacteria. Nature 430: 1024-1027.
- Griffiths, B.S., Hallett, P.D., Kuan, H.L., Gregory, A.S., Watts, C.W., Whitmore, A.P. (2008). Functional resilience of soil microbial communities depends on both soil structure and microbial community composition. Biol. Fertil. Soils 44: 745-754.
- Grolleau, E., Bargeot, L., Chafchafi, A., Hardy, R., Doux, J., Beaudou, A., *et al.* (2004). Le système d'information national sur les sols : DONESOL et les outils associés. Etude et gestion des sols 11: 255-269.
- Gruber, T.M., Gross, C.A. (2003). Multiple Sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. Annu. Rev. Microbiol. 57: 441-466.

- Gründling, A., Burrack, L.S., Bouwer, H.G.A., Higgins, D.E. (2004). *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. P. Natl Acad. Sci. U. S. A. 101: 12318-12323.
- Guha, S., Klees, M., Wang, X.X., Li, J., Dong, Y.Q., Cao, M. (2013). Influence of planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* on *Caenorhabditis elegans*. Arch. Microbiol. 195: 19-26.
- Hain, T., Hossain, H., Chatterjee, S.S., Machata, S., Volk, U., Wagner, S., *et al.* (2008). Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e Sigma B regulon. BMC Microbiol. 8: 12.
- Hain, T., Ghai, R., Billion, A., Kuenne, C.T., Steinweg, C., Izar, B., *et al.* (2012). Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. Bmc Genomics 13: 17.
- Haldenwang, W.G. (1995). The Sigma factors of *Bacillus subtilis*. Microbiol. Rev. 59: 1-30.
- Hallin, S., Welsh, A., Stenström, J., Hallet, S., Enwall, K., Bru, D., *et al.* (2012). Soil functional operating range linked to microbial biodiversity and community composition using denitrifiers as model guild. PLoS ONE 7: e51962. doi:51910.51371/journal.pone.0051962.
- Halter, E.L., Neuhaus, K., Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 641-647.
- Hamilton, W.D. (1964). The genetical evolution of social behaviour, I & II. J. Theor. Biol. 7: 1-52.
- Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nat. Rev. Microbiol. 4: 423-434.
- Hardie, K.R., Heurlier, K. (2008). Establishing bacterial communities by 'word of mouth': LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. Nat. Rev. Microbiol. 6: 635-643.
- Harvey, J., Gilmour, A. (2001). Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and nondairy foods by pulsed-field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and cadmium and antibiotic resistance determination. Appl. Environ. Microbiol. 67: 840-847.
- Henke, J.M., Bassler, B.L. (2004). Bacterial social engagements. Trends in Cell Biology 14: 648-656.
- Hense, B.A., Kuttler, C., Mueller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., Kreft, J.U. (2007). Opinion - Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? Nat. Rev. Microbiol. 5: 230-239.
- Hense, B.A., Müller, J., Kuttler, C., Hartmann, A. (2012). Spatial heterogeneity of autoinducer regulation systems. Sensors 12: 4156-4171.

- Heurlier, K., Denervaud, V., Haas, D. (2006). Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 93-102.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B. (2010). Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 15-25.
- Ho, A.J., Ivanek, R., Groehn, Y.T., Nightingale, K.K., Wiedmann, M. (2007). *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. *Prev Vet Med* 80: 287-305.
- Holah, J.T., Bird, J., Hall, K.E. (2004). The microbial ecology of high-risk, chilled food factories; evidence for persistent *Listeria* spp. and *Escherichia coli* strains. *J. Appl. Microbiol.* 97: 68-77.
- Horswill, A.R., Stoodley, P., Stewart, P.S., Parsek, M.R. (2007). The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 371-380.
- Hu, H.W., Zhang, L.M., Dai, Y., Di, H.J., He, J.Z. (2013a). pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing. *J. Soils Sediments* 13: 1439-1449.
- Hu, H.W., Zhang, L.M., Yuan, C.L., He, J.Z. (2013b). Contrasting Euryarchaeota communities between upland and paddy soils exhibited similar pH-impacted biogeographic patterns. *Soil Biol. Biochem.* 64: 18-27.
- Hu, Y., Oliver, H.F., Raengpradub, S., Palmer, M.E., Orsi, R.H., Wiedmann, M., *et al.* (2007a). Transcriptomic and phenotypic analyses suggest a network between the transcriptional regulators HrcA and sigma(B) in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 73: 7981-7991.
- Hu, Y., Oliver, H.F., Raengpradub, S., Palmer, M.E., Orsi, R.H., Wiedmann, M., *et al.* (2007b). Transcriptomic and phenotypic analyses suggest a network between the transcriptional regulators HrcA and Sigma B in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7981-7991.
- Hu, Y., Raengpradub, S., Schwab, U., Loss, C., Orsi, R.H., Wiedmann, M., *et al.* (2007c). Phenotypic and transcriptomic analyses demonstrate interactions between the transcriptional regulators CtsR and Sigma B in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7967-7980.
- Hu, Y., Raengpradub, S., Schwab, U., Loss, C., Orsi, R.H., Wiedmann, M., *et al.* (2007d). Phenotypic and transcriptomic analyses demonstrate interactions between the transcriptional regulators CtsR and sigma(B) in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 73: 7967-7980.
- Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., Leadbetter, J.R. (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5941-5949.

- Huang, Y.Y., Suo, Y.J., Shi, C.L., Szlavik, J., Shi, X.M., Knochel, S. (2013). Mutations in *gltB* and *gltC* reduce oxidative stress tolerance and biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G. Int. J. Food Microbiol. 163: 223-230.
- Hughes, K.T., Mathee, K. (1998). The anti-Sigma factors. Annu. Rev. Microbiol. 52: 231-286.
- Huillet, E., Velge, P., Vallaëys, T., Pardon, P. (2006). LadR, a new PadR-related transcriptional regulator from *Listeria monocytogenes*, negatively regulates the expression of the multidrug efflux pump MdrL. FEMS Microbiol. Lett. 254: 87-94.
- Hunt, K., Drummond, N., Murphy, M., Butler, F., Buckley, J., Jordan, K. (2012). A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. Irish Vet. J. 65: 13.
- Hutchison, C.E., Kieber, J.J. (2002). Cytokinin signaling in *arabidopsis*. Plant Cell 14: 47-59.
- Iida, T., Kanzaki, M., Maruyama, T., Inoue, S., Kaneuchi, C. (1991). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. J Vet Med Sci 53: 873-875.
- INVS. (2011). Listériose, données épidémiologique. <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Listeriose/Donnees-epidemiologiques>.
- Jablasone, J., Warriner, K., Griffiths, M. (2005). Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. Int. J. Food Microbiol. 99: 7-18.
- Jacob, F., Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3: 318-356.
- Jacquet, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchrieser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., *et al.* (1995). Investigations related to the epidemics strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2242-2246.
- Jamali, H., Chai, L.C., Thong, K.L. (2013). Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. Food Control 32: 19-24.
- Jangid, K., Williams, M.A., Franzluebbers, A.J., Sanderlin, J.S., Reeves, J.H., Jenkins, M.B., *et al.* (2008). Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. Soil Biol. Biochem. 40: 2843-2853.
- Jayaraman, A., Wood, T.K. (2008). Bacterial quorum sensing: Signals, circuits, and implications for biofilms and disease. Annu. Rev. Biomed. Eng. 10: 145-167.
- Ji, G., Beavis, R., Novick, R.P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. Science 276: 2027-2030.
- Jiricny, N., Molin, S., Foster, K., Diggle, S.P., Scanlan, P.D., Ghoul, M., *et al.* (2014). Loss of social behaviours in populations of *Pseudomonas aeruginosa* infecting lungs of

- patients with cystic fibrosis. PLoS ONE 9: e83124. doi:83110.81371/journal.pone.0083124.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. Cell 110: 551-561.
- Johnsen, B.O., Lingaas, E., Torfoss, D., Strøm, E.H., Nordøy, I. (2010). A large outbreak of *Listeria monocytogenes* infection with short incubation period in a tertiary care hospital. J. Infect. 61: 465-470.
- Joyet, P., Derkaoui, M., Poncet, S., Deutscher, J. (2010). Control of *Bacillus subtilis* *mtl* operon expression by complex phosphorylation-dependent regulation of the transcriptional activator MtlR. Mol. Microbiol. 76: 1279-1294.
- Kaern, M., Elston, T.C., Blake, W.J., Collins, J.J. (2005). Stochasticity in gene expression: From theories to phenotypes. Nat. Rev. Gen. 6: 451-464.
- Kallipolitis, B.H., Ingmer, H., Gahan, C.G., Hill, C., Sogaard-Andersen, L. (2003). CesRK, a two-component signal transduction system in *Listeria monocytogenes*, responds to the presence of cell wall-acting antibiotics and affects beta-lactam resistance. Antimicrob. Agents and Ch. 47: 3421-3429.
- Kalorey, D.R., Kurkure, N.V., Warke, S.R., Rawool, D.B., Malik, S.V.S., Barbuddhe, S.B. (2006). Isolation of pathogenic *Listeria monocytogenes* in faeces of wild animals in captivity. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 29: 295-300.
- Kamono, A., Matsumoto, J., Kojima, H., Fukui, M. (2009). Characterization of myxomycete communities in soil by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)-based method. Soil Biol. Biochem. 41: 1324-1330.
- Kamp, H.D., Higgins, D.E. (2009). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the GmaR antirepressor governs temperature-dependent control of flagellar motility in *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 74: 421-435.
- Kamp, H.D., Higgins, D.E. (2011). A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. PLoS Pathog. 7: e1002153. doi:1002110.1001371/journal.ppat.1002153.
- Kaplan, H.B., Greenberg, E.P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. J. Bacteriol. 163: 1210-1214.
- Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J., Wiedmann, M. (2003). *Listeria monocytogenes* Sigma B regulates stress response and virulence functions. J. Bacteriol. 185: 5722-5734.
- Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2006). Contributions of *Listeria monocytogenes* sigma(B) and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. Microbiology-(UK) 152: 1827-1838.
- Keller, L., Surette, M.G. (2006). Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nature 4: 249-258.

- Kim, J., Miller, C.M., Shepherd Jr, M.W., Liu, X., Jiang, X. (2011). Impact of indigenous microorganisms on *Escherichia coli* O157:H7 growth in cured compost. *Bioresource Technol.* 102: 9619-9625.
- Kim, K.S. (2008). Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 625-634.
- Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B. (2010). An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J. Bacteriol.* 192: 5906-5913.
- Knudsen, G.M., Olsen, J.E., Dons, L. (2004). Characterization of DegU, a response regulator in *Listeria monocytogenes*, involved in regulation of motility and contributes to virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 240: 171-179.
- Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., *et al.* (2010). Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007. *Foodborne Pathog. Dis.* 7: 1581-1584.
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., Engelberg-Kulka, H. (2007). A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 318: 652-655.
- Kuenne, C., Voget, S., Pischmarov, J., Oehm, S., Goesmann, A., Daniel, R., *et al.* (2010). Comparative analysis of plasmids in the genus *Listeria*. *PLoS ONE* 5: e12511. doi:10.1371/journal.pone.0012511.
- Kumar, S., Parvathi, A., George, J., Krohne, G., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2009). A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *World J. Microb. Biot.* 25: 527-531.
- Kuo, J.T., Chang, Y.J., Tseng, C.P. (2003). Growth rate regulation of *lac* operon expression in *Escherichia coli* is cyclic AMP dependent. *FEBS Lett.* 553: 397-402.
- Kutter, S., Hartmann, A., Schmid, M. (2006). Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 262-271.
- Kuzina, L.V., Peloquin, J.J., Vacek, D.C., Miler, T.A. (2001). Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera : Tephritidae). *Curr. Microbiol.* 42: 290-294.
- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S. (2004). Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 186: 692-698.
- Laksanalamai, P., Joseph, L.A., Silk, B.J., Burall, L.S., Tarr, C.L., Gerner-Smidt, P., *et al.* (2012). Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in a multistate listeriosis outbreak associated with cantaloupe in US. *PLoS One* 7: e42448. doi:10.1371/journal.pone.0042448.

- Lapanje, A., Zrimec, A., Drobne, D., Rupnik, M. (2010). Long-term Hg pollution-induced structural shifts of bacterial community in the terrestrial isopod (*Porcellio scaber*) gut. *Environ. Pollut.* 158: 3186-3193.
- Larsen, M.H., Leisner, J.J., Ingmer, H. (2010). The chitinolytic activity of *Listeria monocytogenes* EGDe is regulated by carbohydrates but also by the virulence regulator PrfA. *Appl Environ Microbiol* 76: 6470-6476.
- Latorre, A.A., Kessel, J.A.S.V., Karns, J.S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Zadoks, R.N., *et al.* (2009). Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: Evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1315-1323.
- Latorre, A.A., Kessel, J.S.V., Karns, J.S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Boor, K.J., *et al.* (2010). Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* 93: 2792-2802.
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2407-2415.
- Law, R., Morton, R.D. (1995). Permanence and the assembly of ecological communities. *Ecology* 77: 762-775.
- Lebrun, M., Loulergue, J., Chaslusdancla, E., Audurier, A. (1992). Plasmids in *Listeria monocytogenes* in relation to cadmium resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3183-3186.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A.D., Le Fleche-Mateos, A., Roche, S.M., *et al.* (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Sys. Evol. Micr.* 60: 2210-2214.
- Lecuit, M., Nelson, D.M., Smith, S.D., Khun, H., Huerre, M., Vacher-Lavenu, M.-C.c., *et al.* (2004). Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: Role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *PNSA* 101: 6152-6157.
- Ledala, N., Sengupta, M., Muthaiyan, A., Wilkinson, B.J., Jayaswal, R.K. (2010). Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* to iron limitation and *fur* mutation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 406-416.
- Lee, J.H., Choi, C.W., Lee, T., Kim, S.I., Lee, J.C., Shin, J.H. (2013). Transcription factor Sigma B plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE* 8: e73196. doi:73110.71371/journal.pone.0073196.
- Lehmann, L., Keller, L. (2006). The evolution of cooperation and altruism – a general framework and a classification of models. *J. Evol. Biol.* 19: 1365-1376.
- Leigh, J., Fitter, A.H., Hodge, A. (2011). Growth and symbiotic effectiveness of an arbuscular mycorrhizal fungus in organic matter in competition with soil bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76: 428-438.

- Leisner, J.J., Larsen, M.H., Jorgensen, R.L., Brondsted, L., Thomsen, L.E., Ingmer, H. (2008). Chitin hydrolysis by *Listeria* spp., including *L. monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 74: 3823-3830.
- Lemunier, M., Francou, C., Rousseaux, S., Houot, S., Dantigny, P., Piveteau, P., *et al.* (2005). Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5779-5786.
- Liles, M.R., Manske, B.F., Bintrim, S.B., Handelsman, J., Goodman, R.M. (2003). A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl Environ Microbiol* 69: 2684-2691.
- Lina, G., Jarraud, S., Ji, G., Greenland, T., Pedraza, A., Etienne, J., *et al.* (1998). Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 28: 655-662.
- Little, A.E.F., Robinson, C.J., Peterson, S.B., Raffa, K.E., Handelsman, J. (2008). Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 62: 375-401.
- Liu, Y., Mu, C.H., Ying, X.M., Li, W.J., Wu, N., Dong, J., *et al.* (2011). RNAIII activates map expression by forming an RNA-RNA complex in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* 585: 899-905.
- Liu, Y.H., Morgan, S., Ream, A., Huang, L.H. (2013). Gene expression profiling of a nisin-sensitive *Listeria monocytogenes* Scott A *ctsR* deletion mutant. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40: 495-505.
- Lobel, L., Sigal, N., Borovok, I., Ruppin, E., Herskovits, A.A. (2012). Integrative genomic analysis identifies isoleucine and CodY as regulators of *Listeria monocytogenes* virulence. *PLoS Genet.* 8: e1002887. doi:1002810.1001371/journal.pgen.1002887.
- Locatelli, A., Depret, G., Jolivet, C., Henry, S., Dequiedt, S., Piveteau, P., *et al.* (2013a). Nation-wide study of the occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils using culture-based and molecular detection methods. *J. Microbiol Meth.* 93: 242-250.
- Locatelli, A., Spor, A., Jolivet, C., Piveteau, P., Hartmann, A. (2013b). Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS ONE* 8: e75969. doi:75910.71371/journal.pone.0075969.
- Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., *et al.* (2009). A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139: 770-779.
- Lopez, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2009). Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & Development* 23: 1631-1638.
- Ly, T.M.C., Muller, H.E. (1990). Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J. Med. Microbiol.* 33: 51-54.

- Lyautey, E., Hartmann, A., Pagotto, F., Tyler, K., Lapen, D.R., Wilkes, G., *et al.* (2007a). Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. *Can. J. Microbiol.* 53: 1158-1167.
- Lyautey, E., Lapen, D.R., Wilkes, G., McCleary, K., Pagotto, F., Tyler, K., *et al.* (2007b). Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5401-5410.
- Lyon, G.J., Novick, R.P. (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* 25: 1389-1403.
- Macgowan, A.P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P.M., Reeves, D.S. (1994). The occurrence and seasonal-changes in the isolation of *Listeria* spp in shop bought food stuffs, human feces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 325-334.
- Maherali, H., Klironomos, J.N. (2007). Influence of Phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316: 1746-1748.
- Mandin, P., Fsihi, H., Dussurget, O., Vergassola, M., Milohanic, E., Toledo-Arana, A., *et al.* (2005). VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol. Microbiol.* 57: 1367-1380.
- Mandin, P., Repoila, F., Vergassola, M., Geissmann, T., Cossart, P. (2007). Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 35: 962-974.
- Mandin, P., Guillier, M. (2013). Expanding control in bacteria: interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* 16: 125-132.
- Mansfield, B.E., Dionne, M.S., Schneider, D.S., Freitag, N.E. (2003). Exploration of host-pathogen interactions using *Listeria monocytogenes* and *Drosophila melanogaster*. *Cell. Microbiol.* 5: 901-911.
- Marilley, L., Aragno, M. (1999). Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil Ecol.* 13: 127-136.
- Markowitz, V.M., Chen, I.M.A., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., *et al.* (2012). IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res.* 40: 115-122.
- Marshall, K.C., Alexander, M. (1960). Competition between soil bacteria and fusarium. *Plant Soil* 12: 143-153.
- Mascher, T., Helmann, J.D., Unden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 70: 910-+.

- Masuda, S., Murakami, K.S., Olson, S., Donigian, J., Leon, F., Darst, S.A., *et al.* (2004). Crystal structures of the ADP and ATP bound forms of the *Bacillus* anti-Sigma factor SpoIIAB in complex with the anti-anti-Sigma SpoIIAA. *J. Mol. Biol.* 340: 941-956.
- Mata, M.T., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C. (2000). A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 187: 185-188.
- Matos, A., Kerkhof, L., Garland, J.L. (2005). Effects of microbial community diversity on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the wheat rhizosphere. *Microb. Ecol.* 49: 257-264.
- Mattila, M., Somervuo, P., Rattei, T., Korkeala, H., Stephan, R., Tasara, T. (2012). Phenotypic and transcriptomic analyses of Sigma L-dependent characteristics in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Food Microbiol.* 32: 152-164.
- McLauchlin, J., Low, J.C. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults - an occupational-disease of veterinarians and farmers. *Vet. Rec.* 135: 615-617.
- McLaughlin, H.P., Casey, P.G., Cotter, J., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2011). Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Arch. Microbiol.* 193: 775-785.
- Mellin, J.R., Cossart, P. (2012). The non-coding RNA world of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *RNA Biol.* 9: 372-378.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., Cossart, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84: 923-932.
- Michel, E., Stephan, R., Tasara, T. (2011). The *lmo0501* gene coding for a putative transcription activator protein in *Listeria monocytogenes* promotes growth under cold, osmotic and acid stress conditions. *Food Microbiol.* 28: 1261-1265.
- Michiels, J., Dirix, G., Vanderleyden, J., Xi, C. (2001). Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 9: 164-168.
- Miettinen, M.K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Bjorkroth, K.J., Korkeala, H.J. (1999). Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2358-2360.
- Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M., Youngman, P. (1997). Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 23: 1075-1085.
- Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-199.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppee, J.Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vazquez-Boland, J.A., *et al.* (2003). Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol. Microbiol.* 47: 1613-1625.

- Min, K.T., Hilditch, C.M., Diederich, B., Errington, J., Yudkin, M.D. (1993). Sigma F, the 1st compartment-specific transcription factor of *Bacillus subtilis*, is regulated by an anti-Sigma factor that is also a protein-kinase. *Cell* 74: 735-742.
- Mohammed, H.O., Atwill, E., Dunbar, L., Ward, T., McDonough, P., Gonzalez, R., *et al.* (2010). The risk of *Listeria monocytogenes* infection in beef cattle operations. *J. Appl. Microbiol.* 108: 349-356.
- Mokta, K.K., Kanga, A.K., Kaushal, R.K. (2010). Neonatal listeriosis: A case report from sub-Himalayas. *Indian Journal of Medical Microbiology* 28: 385-U167.
- Morfeldt, E., Taylor, D., Vongabain, A., Arvidson, S. (1995). Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *Embo J.* 14: 4569-4577.
- Morild, R.K., Olsen, J.E., Aabo, S. (2011). Change in attachment of *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, and *Listeria monocytogenes* to pork skin and muscle after hot water and lactic acid decontamination. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 353-358.
- Morohoshi, T., Wang, W.Z., Suto, T., Saito, Y., Ito, S., Someya, N., *et al.* (2013). Phenazine antibiotic production and antifungal activity are regulated by multiple quorum-sensing systems in *Pseudomonas chlororaphis* subsp *aurantiaca* StFRB508. *J. Biosci. Bioeng.* 116: 580-584.
- Moshtaghi, H., Garg, S.R., Mandokhot, U.V. (2009). Survivability of *Listeria monocytogenes* in agricultural field soil. *Indian J. Vet. Res.* 18: 1-7.
- Mraheil, M.A., Billion, A., Mohamed, W., Mukherjee, K., Kuenne, C., Pischmarov, J., *et al.* (2011). The intracellular sRNA transcriptome of *Listeria monocytogenes* during growth in macrophages. *Nucleic Acids Res.* 39: 4235-4248.
- Mujahid, S., Orsi, R.H., Boor, K.J., Wiedmann, M. (2013a). Protein level identification of the *Listeria monocytogenes* Sigma H, Sigma L, and Sigma C regulons. *BMC Microbiol.* 13: doi:10.1186/1471-2180-1113-1156.
- Mujahid, S., Orsi, R.H., Vangay, P., Boor, K.J., Wiedmann, M. (2013b). Refinement of the *Listeria monocytogenes* Sigma B regulon through quantitative proteomic analysis. *Microbiology* 159: 1109-1119.
- Müller-Hill, B. (1996). *The lac operon: A short history of a genetic paradigm*. Walter de Gruyter: New York.
- Mylonakis, E., Engelbert, M., Qin, X., Sifri, C.D., Murray, B.E., Ausubel, F.M., *et al.* (2002). The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect. Immun.* 70: 4678-4681.
- Nair, S., Derre, I., Msadek, T., Gaillot, O., Berche, P. (2000). CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35: 800-811.

- Najafi, S.M.A., Willis, A.C., Yudkin, M.D. (1995). Site of phosphorylation of SpoIIAA, the anti-anti-Sigma factor for sporulation-specific Sigma F of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 177: 2912-2913.
- Nakayama, J., Chen, S.M., Oyama, N., Nishiguchi, K., Azab, E.A., Tanaka, E., *et al.* (2006). Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: The small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD. J. Bacteriol. 188: 8321-8326.
- Nakayama, J., Uemura, Y., Nishiguchi, K., Yoshimura, N., Igarashi, Y., Sonomoto, K. (2009). Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quormones in gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Ch. 53: 580-586.
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. J. Bacteriol. 104: 313-322.
- Ng, W.L., Bassler, B.L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. In Annual Review of Genetics. pp. 197-222.
- Nielsen, J.S., Olsen, A.S., Bonde, M., Valentin-Hansen, P., Kallipolitis, B.H. (2008). Identification of a Sigma B-dependent small noncoding RNA in *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 190: 6264-6270.
- Nielsen, J.S., Larsen, M.H., Lillebaek, E.M.S., Bergholz, T.M., Christiansen, M.H.G., Boor, K.J., *et al.* (2011). A small RNA controls expression of the chitinase ChiA in *Listeria monocytogenes*. PLoS ONE 6: e19019. doi:10.1371/journal.pone.0019019.
- Nightingale, K.K., Schukken, Y.H., Nightingale, C.R., Fortes, E.D., Ho, A.J., Her, Z., *et al.* (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4458-4467.
- Nightingale, K.K., Fortes, E.D., Ho, A.J., Schukken, Y.H., Grohn, Y.T., Wiedmann, M. (2005). Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227: 1808-1814.
- Nou, X.W., Kadner, R.J. (2000). Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to *btuB* RNA. P. Natl Acad. Sci. U. S. A. 97: 7190-7195.
- Novick, R.P., Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in *Staphylococci*. Annu. Rev. Genet. 42: 541-564.
- Oliveira, M., Usall, J., Vinas, I., Solsona, C., Abadias, M. (2011). Transfer of *Listeria innocua* from contaminated compost and irrigation water to lettuce leaves. Food Microbiol. 28: 590-596.
- Oliver, H., Orsi, R., Ponnala, L., Keich, U., Wang, W., Sun, Q., *et al.* (2009). Deep RNA sequencing of *Listeria monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and Sigma B-dependent transcriptomes, including multiple highly transcribed noncoding RNAs. BMC Genomics 10: 641.

- Oliver, H.F., Orsi, R.H., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2010). *Listeria monocytogenes* Sigma B has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 4216-4232.
- Ollinger, J., Bowen, B., Wiedmann, M., Boor, K.J., Bergholz, T.M. (2009a). *Listeria monocytogenes* Sigma B modulates PrfA-mediated virulence factor expression. *Infect. Immun.* 77: 2113-2124.
- Ollinger, J., Bowen, B., Wiedmann, M., Boor, K.J., Bergholz, T.M. (2009b). *Listeria monocytogenes* sigma(B) modulates PrfA-mediated virulence factor expression. *Infect Immun* 77: 2113-2124.
- Orgaz, B., Puga, C.H., Martinez-Suarez, J.V., SanJose, C. (2013). Biofilm recovery from chitosan action: A possible clue to understand *Listeria monocytogenes* persistence in food plants. *Food Control* 32: 484-489.
- Orsi, R.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301: 79-96.
- Oslizlo, A., Stefanic, P., Dogsa, I., Mandic-Mulec, I. (2014). Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 1586-1591.
- Osterberg, S., del Peso-Santos, T., Shingler, V. (2011). Regulation of alternative Sigma factor use. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 37-55.
- Paillard, D., Dubois, V., Thiebaut, R., Nathier, F., Hoogland, E., Caumette, P., *et al.* (2005). Occurrence of *Listeria* spp. in effluents of French urban wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7562-7566.
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *TRENDS Microbiol.* 13: 27-33.
- Paspaliari, D.K., Mollerup, M.S., Kallipolitis, B.H., Ingmer, H., Larsen, M.H. (2014). Chitinase expression in *Listeria monocytogenes* is positively regulated by the Agr system. *PLoS ONE* 9: e95385. doi:95310.91371/journal.pone.0095385.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260: 1127-1130.
- Patzelt, D., Wang, H., Buchholz, I., Rohde, M., Grobe, L., Pradella, S., *et al.* (2013). You are what you talk: quorum sensing induces individual morphologies and cell division modes in *Dinoroseobacter shibae*. *ISME J.* 7: 2274-2286.
- Pauly, T.M., Tham, W.A. (2003). Survival of *Listeria monocytogenes* in wilted and additive-treated grass silage. *Acta Vet. Scand.* 44: 73-86.

- Pearson, J.P., Pesci, E.C., Iglewski, B.H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179: 5756-5767.
- Pei, D.H., Zhu, J.G. (2004). Mechanism of action S-ribosylhomocysteinase (LuxS). *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 492-497.
- Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., Schlievert, P. (1988). Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (Agr) in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 170: 4365-4372.
- Perez-Rueda, E., Collado-Vides, J. (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 28: 1838-1847.
- Perez, P.D., Hagen, S.J. (2010). Heterogeneous response to a quorum-sensing signal in the luminescence of individual *Vibrio fischeri*. *PLoS ONE* 5: e15473. doi:15410.11371/journal.pone.0015473.
- Philippot, L., Bru, D., Saby, N.P.A., Cuhel, J., Arrouays, D., Simek, M., *et al.* (2009). Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environ. Microbiol.* 11: 3096-3104.
- Philippot, L., Andersson, S.G.E., Battin, T.J., Prosser, J.I., Schimel, J.P., Whitman, W.B., *et al.* (2010). The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 523-529.
- Philippot, L., Spor, A., Hénault, C., Bru, D., Bizouard, F., Jones, C.M., *et al.* (2013). Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME J* 2013; e-pub ahead of print 7 march 2013; doi: 10.1038/ismej.2013.34.
- Piveteau, P., Depret, G., Pivato, B., Garmyn, D., Hartmann, A. (2011). Changes in gene expression during adaptation of *Listeria monocytogenes* to the soil environment. *PLoS ONE* 6: e24881. doi:24810.21371/journal.pone.0024881.
- Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A., Cossart, P. (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: An updated view. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Popowska, M., Osinska, M., Rzeczowska, M. (2012). N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (NagA) of *Listeria monocytogenes* EGD-e, an essential enzyme for the metabolism and recycling of amino sugars. *Arch. Microbiol.* 194: 255-268.
- Porto-Fett, A.C.S., Pierre, J., Shoyer, B.A., Luchansky, J.B. (2013). Effect of storage temperatures and cooking times on viability of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in/on goetta. *Journal of Food Safety* 33: 128-136.
- Puitika, T., Kasahara, Y., Miyoshi, N., Sato, Y., Shimano, S. (2007). A taxon-specific oligonucleotide primer set for PCR-based detection of soil ciliate. *Microbes and Environments* 22: 78-81.
- Pushkareva, V.I., Ermolaeva, S.A. (2010). *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena*

- pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. BMC Microbiol. 10: doi: 10.1186/1471-2180-1110-1126.
- Puskas, A., Greenberg, E.P., Kaplan, S., Schaefer, A.L. (1997). A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 179: 7530-7537.
- Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E. (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. Infect. Immun. 68: 2579-2586.
- Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E. (2001). Characterization of Fsr, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. J. Bacteriol. 183: 3372-3382.
- Queck, S.Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A.E., Bach, T.-H.L., Khan, B.A., Sturdevant, D.E., et al. (2008). RNAIII-independent target gene control by the Agr quorum-sensing system: Insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. Mol. Cell 32: 150-158.
- Radl, V., Gatteringer, A., Chronakova, A., Nemcova, A., Cuhel, J., Simek, M., et al. (2007). Effects of cattle husbandry on abundance and activity of methanogenic archaea in upland soils. ISME J. 1: 443-452.
- Raengpradub, S., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2008). Comparative analysis of the Sigma B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. Appl. Environ. Microbiol. 74: 158-171.
- Raimann, E., Schmid, B., Stephan, R., Tasara, T. (2009). The alternative Sigma factor Sigma L of *L. monocytogenes* promotes growth under diverse environmental stresses. Foodborne Pathog. Dis. 6: 583-591.
- Rainey, P.B., Rainey, K. (2003). Evolution of cooperation and conflict in experimental bacterial populations. Nature 425: 72-74.
- Ray, V.A., Visick, K.L. (2012). LuxU connects quorum sensing to biofilm formation in *Vibrio fischeri*. Mol. Microbiol. 86: 954-970.
- Rea, R., Hill, C., Gahan, C.G.M. (2005). *Listeria monocytogenes* *PerR* mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. Appl. Environ. Microbiol. 71: 8314-8322.
- Rea, R.B., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2004). Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. Infect. Immun. 72: 717-727.
- Reading, N.C., Sperandio, V. (2006). Quorum sensing: the many languages of bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 254: 1-11.
- Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A., Novick, R.P. (1986). Regulation of exoprotein gene-expression in *Staphylococcus aureus* by Agr. Mol. Gen. Genet. 202: 58-61.

- Redfield, R.J. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol.* 10: 365-370.
- Renier, S., Hébraud, M., Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environ. Microbiol.* 13: 835-850.
- Repoila, F., Darfeuille, F. (2009). Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: Physiology and mechanistic aspects. *Biol. Cell* 101: 117-131.
- Reynolds, J., Wigneshweraraj, S. (2011). Molecular insights into the control of transcription initiation at the *Staphylococcus aureus agr* operon. *J. Mol. Biol.* 412: 862-881.
- Rezzonico, F., Duffy, B. (2008). Lack of genomic evidence of AI-2 receptors suggests a non-quorum sensing role for *luxS* in most bacteria. *BMC Microbiol.* 8: 154.
- Riedel, C.U., Monk, I.R., Casey, P.G., Waidmann, M.S., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2009). AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 71: 1177-1189.
- Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., Guzzo, J. (2007). *agr* system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6125-6133.
- Rieu, A., Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., Piveteau, P. (2008). *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4491-4497.
- Ringus, D.L., Ivy, R.A., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2012). Salt stress-induced transcription of Sigma B- and CtsR-regulated genes in persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains from food processing plants. *Foodborne Pathog. Dis.* 9: 198-206.
- Roberts, A.J., M.Wiedmann. (2003). Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 904-918.
- Robichon, D., Gouin, E., Debarbouille, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y., Hechard, Y. (1997). The *rpoN* Sigma 54 gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 179: 7591-7594.
- Rocourt, J., Goulet, V., Lepoutretoulemon, A., Jacquet, C., Catimel, B., Rebiere, I., *et al.* (1993). Outbreak of listeriosis in France 1992. *Med. Mal. Infect.* 23: 481-484.
- Rocourt, J., BenEmbarek, P., Toyofuku, H., Schlundt, J. (2003). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 263-267.
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., *et al.* (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* 4: 1340-1351.

- Ruby, E.G., McFallngai, M.J. (1992). A squid that glows in the night- development of an animal-bacterial mutualism. *J. Bacteriol.* 174: 4865-4870.
- Rumbaugh, K.P., Trivedi, U., Watters, C., Burton-Chellew, M.N., Diggle, S.P., West, S.A. (2012). Kin selection, quorum sensing and virulence in pathogenic bacteria. *P. Roy. Soc. B Bio.* 279: 3584-3588.
- Ryan, S., Hill, C., Gahan, C.G.M. (2008) Acid stress responses in *Listeria monocytogenes*. In *Adv. Appl. Microbiol.* San Diego: Elsevier Academic Press Inc, pp. 67-91.
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: Regulation and role in acid tolerance. *Environ. Microbiol.* 11: 432-445.
- Ryser, E.T., Marth, E.H. (1999a) The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy and identification. In *Listeria, listeriosis and food safety*. E T Ryser (ed) New York, N. Y.: Marcel Dekker, pp. 1-20.
- Ryser, E.T., Marth, E.H. (1999b) Listeriosis in animals. In *Listeria, listeriosis and food safety*. E T Ryser (ed) New York, N. Y.: Marcel Dekker, pp. 39-73.
- Salazar, J.K., Wu, Z.C., Yang, W.X., Freitag, N.E., Tortorello, M.L., Wang, H., *et al.* (2013). Roles of a novel Crp/Fnr family transcription factor Lmo0753 in soil survival, biofilm production and surface attachment to fresh produce of *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE* 8: e75736. doi:75710.71371/journal.pone.0075736.
- Salunkhe, P., Smart, C.H.M., Morgan, J.A.W., Panagea, S., Walshaw, M.J., Hart, C.A., *et al.* (2005). A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. *J. Bacteriol.* 187: 4908-4920.
- Sandoz, K.M., Mitzimberg, S.M., Schuster, M. (2007). Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *P. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 104: 15876-15881.
- Sauders, B.D., Overdevest, J., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo, A., *et al.* (2012). Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 4420-4433.
- Schaber, J.A., Carty, N.L., McDonald, N.A., Graham, E.D., Cheluvappa, R., Griswold, J.A., *et al.* (2004). Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 53: 841-853.
- Schaefer, A.L., Hanzelka, B.L., Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2000). Detection, purification, and structural elucidation of the acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods Enzymol.* 305: 288-301.
- Schaffter, N., Parriaux, A. (2002). Pathogenic-bacterial water contamination in mountainous catchments. *Water Res.* 36: 131-139.
- Schaffter, N., Zumstein, J., Parriaux, A. (2004). Factors influencing the bacteriological water quality in mountainous surface and groundwaters. *Acta Hydroch. Hydrob.* 32: 225-234.

- Schaller, G.E., Shiu, S.H., Armitage, J.P. (2011). Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Curr. Biol.* 21: R320-R330.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G., Bassler, B.L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* 41: 463-476.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., *et al.* (1983). Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.* 308: 203-206.
- Scortti, M., Monzó, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., Vázquez-Boland, J.A. (2007). The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* 9: 1196-1207.
- Sekirov, I., Finlay, B.B. (2009). The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J. Physiol.* 587: 4159-4167.
- Sela, S., Frank, S., Belausov, E., Pinto, R. (2006). A mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5653-5658.
- Serio, A., Chaves-Lopez, C., Paparella, A. (2011). *Listeria monocytogenes* isolated from the smoked salmon industry: Growth potential under different environmental conditions. *Food Control* 22: 2071-2075.
- Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R., Cossart, P. (2013). The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 75-82.
- Severino, P., Dussurget, O., Vencio, R.Z.N., Dumas, E., Garrido, P., Padilla, G., *et al.* (2007). Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall and stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6078-6088.
- Sezen, X., Demir, I., Demirbag, Z. (2004). Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L. (*Coleoptera* : *Chrysomelidae*). *Biologia* 59: 327-331.
- Shapiro, J.A. (1988). Bacteria as multicellular organisms. *Sci. Am.* 258: 82-89.
- Shaun, C., Alicia, C., Gail, W., Tista, G., Richard, V., Paul, T., *et al.* (2011). Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen farms cantaloupe. United States, august-september 2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 60: 1357-1358.
- Shen, C.C., Xiong, J.B., Zhang, H.Y., Feng, Y.Z., Lin, X.G., Li, X.Y., *et al.* (2013). Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. *Soil Biology & Biochemistry* 57: 204-211.
- Shen, Y., Naujokas, K., Park, M., Ireton, K. (2000). InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103: 501-510.
- Shin, J.H., Brody, M.S., Pricet, C.W. (2010a). Physical and antibiotic stresses require activation of the RsbU phosphatase to induce the general stress response in *Listeria monocytogenes*. *Microbiol-UK* 156: 2660-2669.

- Shin, J.H., Kim, J., Kim, S.M., Kim, S., Lee, J.C., Ahn, J.M., *et al.* (2010b). Sigma B-dependent protein induction in *Listeria monocytogenes* during vancomycin stress. FEMS Microbiol. Lett. 308: 94-100.
- Sidorenko, M.L., Buzoleva, L.S., Kostenkov, N.M. (2006). The effect of soil properties on the preservation and reproduction of *Listeria* and *Yersinia*. Eurasian Soil Sci+ 39: 211-217.
- Skerker, J.M., Prasol, M.S., Perchuk, B.S., Biondi, E.G., Laub, M.T. (2005). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: A system-level analysis. PLoS Biol. 3: 1770-1788.
- Slamti, L., Lereclus, D. (2002). A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. Embo J. 21: 4550-4559.
- Slamti, L., Lereclus, D. (2005). Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. J. Bacteriol. 187: 1182-1187.
- Sleator, R.D., Wemekamp-Kamphuis, H.H., Gahan, C.G.M., Abee, T., Hill, C. (2005). A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 55: 1183-1195.
- Sleator, R.D., Watson, D., Hill, C., Gahan, C.G.M. (2009). The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. Microbiology-(UK) 155: 2463-2475.
- Smith, B., Kemp, M., Ethelberg, S., Schiellerup, P., Bruun, B., Gerner-Smidt, P., *et al.* (2009). *Listeria monocytogenes*: Maternal-foetal infections in Denmark 1994-2005. Scand. J. Infect. Dis. 41: 21-25.
- Smith, B., Larsson, J., Lisby, M., Muller, L., Madsen, S., Engberg, J., *et al.* (2011). Outbreak of listeriosis caused by infected beef meat from a meals-on-wheels delivery in Denmark 2009. Clin. Microbiol. Infect. 17: 50-52.
- Sobsey, M.D., Dean, C.H., Knuckles, M.E., Wagner, R.A. (1980). Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. Appl Environ Microbiol 40: 92-101.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., Kaper, J.B. (2003). Bacteria-host communication: The language of hormones. P. Natl Acad. Sci. U. S. A. 100: 8951-8956.
- Steiner, E., Scott, J., Minton, N.P., Winzer, K. (2012). An *agr* quorum sensing system that regulates granule formation and sporulation in *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Environ. Microbiol. 78: 1113-1122.
- Stella, M.C., Comoglio, P.M. (1999). HGF: A multifunctional growth factor controlling cell scattering. Int. J. Biochem. Cell B. 31: 1357-1362.
- Stenz, L., Francois, P., Whiteson, K., Wolz, C., Linder, P., Schrenzel, J. (2011). The CodY pleiotropic repressor controls virulence in gram-positive pathogens. FEMS Immunol. Med. Mic. 62: 123-139.

- Storz, G., Altuvia, S., Wassarman, K.M. (2005) An abundance of RNA regulators. In Annual Review of Biochemistry. Palo Alto: Annual Reviews, pp. 199-217.
- Strawn, L.K., Fortes, E.D., Bihn, E.A., Nightingale, K.K., Gröhn, Y.T., Worobo, R.W., *et al.* (2013). Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 588-600.
- Strickland, M.S., Lauber, C., Fierer, N., Bradford, M.A. (2009). Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology* 90: 441-451.
- Sturme, M.H.J., Nakayama, J., Molenaar, D., Murakami, Y., Kunugi, R., Fujii, T., *et al.* (2005). An agr-like two-component regulatory system in *Lactobacillus plantarum* is involved in production of a novel cyclic peptide and regulation of adherence. *J. Bacteriol.* 187: 5224-5235.
- Suetsugu, S. (2009). The direction of actin polymerization for vesicle fission suggested from membranes tubulated by the EFC/F-BAR domain protein FBP17. *FEBS Letters* 583: 3401-3404.
- Sun, J.B., Daniel, R., Wagner-Dobler, I., Zeng, A.P. (2004). Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol. Biol.* 4: doi:10.1186/1471-2148-1184-1136.
- Swanson, M.M., Fraser, G., Daniell, T.J., Torrance, L., Gregory, P.J., Talianky, M. (2009). Viruses in soils: morphological diversity and abundance in the rhizosphere. *Annals of Applied Biology* 155: 51-60.
- Tahery, Y., Kafilzade, F., Momtaz, Y.A. (2009). *Listeria monocytogenes* and abortion: A case study of pregnant women in Iran. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3: 826-832.
- Taillefer, C., Boucher, M., Laferrière, C., Lucie Morin, M. (2009). Perinatal listeriosis: Canada's 2008 outbreaks. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 32: 45-48.
- Takahashi, J.A., de Castro, M.C.M., Souza, G.G., Lucas, E.M.F., Bracarense, A.A.P., Abreu, L.M., *et al.* (2008). Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J. Mycol. Med.* 18: 198-204.
- Thomsen, L.E., Slutz, S.S., Tan, M.W., Ingmer, H. (2006). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1700-1701.
- Tilney, L.G., Portnoy, D.A. (1989). Actin-filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 109: 1597-1608.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., *et al.* (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459: 950-956.

- Tomasz, A. (1965). Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature* 208: 155-159.
- Tomsic, J., McDaniel, B.A., Grundy, F.J., Henkin, T.A. (2008). Natural variability in S-adenosylmethionine (SAM)-dependent riboswitches: S-box elements in *Bacillus subtilis* exhibit differential sensitivity to SAM in vivo and in vitro. *J. Bacteriol.* 190: 823-833.
- Tresse, O., Shannon, K., Pinon, A., Malle, P., Vialette, M., Midelet-Bourdin, G. (2007). Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. *J. Food Prot.* 70: 1569-1578.
- Upchurch, R., Chiu, C.-Y., Everett, K., Dyszynski, G., Coleman, D.C., Whitman, W.B. (2008). Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1294-1305.
- Uzeh, R.E., Adepoju, A. (2013). Incidence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. *International Food Research Journal* 20: 1921-1925.
- Valk, H.d., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Simon, F., *et al.* (2005). Surveillance of *Listeria* infections in Europe. *Eurosurveillance* 10.
- van der Veen, S., Hain, T., Wouters, J.A., Hossain, H., de Vos, W.M., Abee, T., *et al.* (2007). The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiol-UK* 153: 3593-3607.
- van der Veen, S., Abee, T. (2010a). Importance of Sigma B for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7854-7860.
- van der Veen, S., Abee, T. (2010b). HrcA and DnaK are important for static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance in *Listeria monocytogenes*. *Microbiol-UK* 156: 3782-3790.
- van der Veen, S., van Schalkwijk, S., Molenaar, D., de Vos, W.M., Abee, T., Wells-Bennik, M.H.J. (2010). The SOS response of *Listeria monocytogenes* is involved in stress resistance and mutagenesis. *Microbiol-UK* 156: 374-384.
- van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Elhottova, D., Kristufek, V., Salles, J.F. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 1159-1164.
- van Houdt, R., Michiels, C. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1117-1131.
- van Renterghem, B., Huysman, F., Rygole, R., Verstraete, W. (1991). Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. *J. Appl. Microb.* 71: 211-217.

- Vazquez-Boland, J.A., Dominguez, L., Blanco, M., Rocourt, J., Fernandezgarayzabal, J.F., Gutierrez, C.B., *et al.* (1992). Epidemiologic investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new *Listeria*-selective enumeration medium and phage typing. *American Journal of Veterinary Research* 53: 368-371.
- Veening, J.W., Stewart, E.J., Berngruber, T.W., Taddei, F., Kuipers, O.P., Hamoen, L.W. (2008). Bet-hedging and epigenetic inheritance in bacterial cell development. *P. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 105: 4393-4398.
- Veiga, E., Cossart, P. (2005). *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nature Cell Biology* 7: 894-U846.
- Velicer, G.J., Kroos, L., Lenski, R.E. (2000). Developmental cheating in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature* 404: 598-601.
- Velicer, G.J. (2003). Social strife in the microbial world. *Trends Microbiol.* 11: 330-337.
- Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C.M., Hardie, K.R. (2005). Making 'sense' of metabolism: Autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 383-396.
- Vidal, J.E., Ma, M., Saputo, J., Garcia, J., Uzal, F.A., McClane, B.A. (2011). Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *Mol. Microbiol.* 83: 1287-1287.
- Visick, K.L., McFall-Ngai, M.J. (2000). An exclusive contract: Specificity in the *Vibrio fischeri* *Euprymna scolopes* partnership. *J. Bacteriol.* 182: 1779-1787.
- Vivant, A.-L., Garmyn, D., Piveteau, P. (2013a). *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3.
- Vivant, A.-L., Garmyn, D., Piveteau, P. (2013b). *Listeria monocytogenes*, a pathogen down-to-earth. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3: doi: 10.3389/fcimb.2013.00087.
- Vivant, A.L., Garmyn, D., Maron, P.A., Nowak, V., Piveteau, P. (2013c). Microbial diversity and structure are drivers of the biological barrier effect against *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS ONE* 8: e76991. doi:76910.71371/journal.pone.0076991.
- Vu-Khac, H., Miller, K.W. (2009). Regulation of mannose phosphotransferase system permease and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* by the EIItMan transporter. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6671-6678.
- Wanasen, N., MacLeod, C.L., Ellies, L.G., Soong, L. (2007). L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infect. Immun.* 75: 2802-2810.
- Wang, M., Chen, J.-K., Li, B. (2007). Characterization of bacterial community structure and diversity in rhizosphere soils of three plants in rapidly changing salt marshes using 16S rDNA. *Pedosphere* 17: 545-556.

- Wang, Q.H., Venkataramanan, K.P., Huang, H.Z., Papoutsakis, E.T., Wu, C.H. (2013). Transcription factors and genetic circuits orchestrating the complex, multilayered response of *Clostridium acetobutylicum* to butanol and butyrate stress. BMC Syst. Biol. 7: 120.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., Losick, R., (2009) Biologie moléculaire du gène. In. Paris: Pearson Education France, pp.
- Weber, A., Potel, J., Schafers Schmidt, R. (1995a). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of pigeons. Berliner Munchener Tierarztl. Wochenschr. 108: 26-27.
- Weber, A., Potel, J., Schafer Schmidt, R., Prell, A., Datzmann, C. (1995b). Investigations on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals. Zbl Hyg. Umweltmed. 198: 117-123.
- Weis, J., Seeliger, H.P.R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30: 29-32.
- Welchman, D.D., Hooton, J.K., Low, J.C. (1997). Ocular disease associated with silage feeding and *Listeria monocytogenes* in fallow deer. Veterinary Record 140: 684-685.
- Welshimer, H.J. (1960). Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. J. Bacteriol. 80: 316-320.
- Welshimer, H.J. (1968). Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. J. Bacteriol. 95: 300-303.
- Welshimer, H.J., Donker-Voet, J. (1971). *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 21: 516-519.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., Hill, C., Abee, T. (2002). Multiple deletions of the osmolyte transporters *BetL*, *Gbu*, and *OpuC* of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. Appl Environ Microbiol 68: 4710-4716.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., de Leeuw, P., Hain, T., Chakraborty, T., Abee, T. (2004). Identification of Sigma factor Sigma B-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3457-3466.
- Wesley, I.V. (1999) Listeriosis in animals. In *Listeria*, listeriosis and food safety, 2nd edition. E T Ryser & E H Marth (eds). New York, N. Y.: Marcel Decker, Inc, pp. 39-73.
- West, S.A., Pen, I., Griffin, A.S. (2002). Conflict and cooperation - Cooperation and competition between relatives. Science 296: 72-75.
- West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A. (2007). Social semantics: Altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. J. Evolution Biol. 20: 415-432.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C. (2001). Quorum-sensing in gram-negative bacteria. Fems Microbiology Reviews 25: 365-404.

- Wiedmann, M., Arvik, T.J., Hurley, R.J., Boor, K.J. (1998). General stress transcription factor Sigma B and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 180: 3650-3656.
- Williams, T., Bauer, S., Beier, D., Kuhn, M. (2005). Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* mutants with in-frame deletions in the response regulator genes identified in the genome sequence. Infect. Immun. 73: 3152-3159.
- Williamson, K.E., Radosevich, M., Wommack, K.E. (2005). Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. Appl Environ Microbiol 71: 3119-3125.
- Winzer, K., Hardie, K.R., Burgess, N., Doherty, N., Kirke, D., Holden, M.T.G., *et al.* (2002a). LuxS: Its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. Microbiol-UK 148: 909-922.
- Winzer, K., Hardie, K.R., Williams, P. (2002b). Bacterial cell-to-cell communication: Sorry, can't talk now - gone to lunch! Curr. Opin. Microbiol. 5: 216-222.
- Wurtzel, O., Sesto, N., Mellin, J.R., Karunker, I., Edelheit, S., Becavin, C., *et al.* (2012). Comparative transcriptomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. Mol Syst Biol 8: 1-14.
- Wuster, A., Babu, M.M. (2008). Conservation and evolutionary dynamics of the agr cell-to-cell communication system across firmicutes. Journal of Bacteriology 190: 743-746.
- Xavier, K.B., Bassler, B.L. (2003). LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. Current Opinion in Microbiology 6: 191-197.
- Xiuping, J., Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P. (2004). Fate of *Listeria monocytogenes* in bovine manure-amended soil. J. Food Prot. 67: 1676-1681.
- Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M., Greenberg, E.P. (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. J. Bacteriol. 186: 1838-1850.
- Yoshida, T., Kato, Y., Sato, M., Hirai, K. (1998). Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. J Vet Med Sci 60: 1165-1168.
- Yu, W.T., Bi, M.L., Xu, Y.G., Zhou, H., Ma, Q., Jiang, C.M. (2013). Microbial biomass and community composition in a Luvisol soil as influenced by long-term land use and fertilization. Catena 107: 89-95.
- Zhang, C.M., Nietfeldt, J., Zhang, M., Benson, A.K. (2005). Functional consequences of genome evolution in *Listeria monocytogenes*: The *lmo0423* and *lmo0422* genes encode Sigma C and LstR, a lineage II-specific heat shock system. J. Bacteriol. 187: 7243-7253.
- Zhou, Q.C., Feng, F.F., Wang, L., Feng, X.Q., Yin, X.J., Luo, Q. (2011). Virulence regulator PrfA is essential for biofilm formation in *Listeria monocytogenes* but not in *Listeria innocua*. Curr. Microbiol. 63: 186-192.

- Zhou, X.H., Elmore, J., Call, D.R. (2007). Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*). Environ. Microbiol. 9: 913-922.

Annexe

Revue : *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen

Cette revue vise à présenter les facteurs extrinsèque et intrinsèque qui impactent l'écologie de *L. monocytogenes* dans l'environnement tellurique. Elle s'articule selon 6 axes :

- L'incidence de *L. monocytogenes* dans le sol. Cette section fait état des cas de détection de *L. monocytogenes* dans les sols agricoles, les champs cultivés, les prairies, les sols de forêt ou l'environnement urbain. Cet état débute par les travaux de Welshimer (1960), qui fut l'un des premiers à mettre en évidence la présence de *L. monocytogenes* dans le sol, et se continue jusqu'aux récents travaux de Locatelli (2013), qui fait un bilan de l'incidence de *L. monocytogenes* sur le territoire Français.

- Les facteurs édaphiques qui impacte la survie de *L. monocytogenes* dans le sol. Les études réalisées par inoculation de *L. monocytogenes* dans des microcosmes de sol ont permis d'identifier des paramètres influençant la survie du pathogène dans le sol. Ces différents paramètres sont exposés dans cette section.

- Les interactions connus entre *L. monocytogenes* et la microflore et la faune. Le sol est un environnement biotique complexe. L'impact des microorganismes et de la faune sur la survie de *L. monocytogenes* a été étudié par des approches expérimentales de microcosmes de sol. Cette section est consacrée aux possibles interactions (compétition, prédation, coopération) de la fraction biotique du sol et de *L. monocytogenes*.

- Les pratiques agricoles potentiellement responsable de l'introduction de *L. monocytogenes* dans le sol. Cette section discute de l'utilisation des amendements organiques, des composts et des eaux usées dans l'agriculture et leur contribution probable à la contamination des sols par *L. monocytogenes*.

- Les facteurs intrinsèques : le génome de *L. monocytogenes*. Cette section fait un bilan des données acquises par séquençage de diverses souches de *L. monocytogenes*. L'importante proportion du génome allouée à la production de protéines de transport, de protéines régulatrices et de systèmes à deux composants pourrait expliquer l'adaptabilité du pathogène dans le sol.

- La biodiversité des souches de *L. monocytogenes* : notion d'écotype. Finalement, cette dernière section discute de l'existence d'écotypes au sein de l'espèce *L. monocytogenes*.



Listeria monocytogenes, a down-to-earth pathogen

Anne-Laure Vivant^{1,2}, Dominique Garmyn^{1,2} and Pascal Piveteau^{1,2*}

¹ UMR1347 Agroécologie, Université de Bourgogne, Dijon, France

² UMR1347 Agroécologie, INRA, Dijon, France

Edited by:

Alain Hartmann, Institut National de la Recherche Agronomique, France

Reviewed by:

Hélène Marquis, Cornell University, USA

Valerio Iebba, 'Sapienza' University of Rome, Italy

*Correspondence:

Pascal Piveteau, UMR1347 Agroécologie, INRA, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France
e-mail: piveteau@u-bourgogne.fr

Listeria monocytogenes is the causative agent of the food-borne life threatening disease listeriosis. This pathogenic bacterium received much attention in the endeavor of deciphering the cellular mechanisms that underlie the onset of infection and its ability to adapt to the food processing environment. Although information is available on the presence of *L. monocytogenes* in many environmental niches including soil, water, plants, foodstuff and animals, understanding the ecology of *L. monocytogenes* in outdoor environments has received less attention. Soil is an environmental niche of pivotal importance in the transmission of this bacterium to plants and animals. Soil composition, microbial communities and macrofauna are extrinsic edaphic factors that direct the fate of *L. monocytogenes* in the soil environment. Moreover, farming practices may further affect its incidence. The genome of *L. monocytogenes* presents an extensive repertoire of genes encoding transport proteins and regulators, a characteristic of the genome of ubiquitous bacteria. Postgenomic analyses bring new insights in the process of soil adaptation. In the present paper focussing on soil, we review these extrinsic and intrinsic factors that drive environmental adaptation of *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria*, soil, contamination, occurrence, biodiversity, persistence, circulation, environment

INTRODUCTION

Circulation of zoonotic and Human pathogens within the biosphere is a major health issue. Agroecosystems may participate to the transmission of pathogens to the food chain through production of contaminated raw products. However, as illustrated in Figure 1, understanding conditions that will trigger such contaminations or, on the opposite that will limit risks of contamination is difficult in the face of the complexity of the ecology of microorganisms. *Listeria monocytogenes* is the agent of listeriosis, a food-borne illness. Health effects range from flu-like symptoms with vomiting and diarrhea in healthy adults to life-threatening diseases such as meningitis and septicemia in vulnerable people and spontaneous abortion in pregnant women. In the light of these health hazards, this bacterium received much attention in order to understand the physiopathology of listeriosis. As a matter of fact, *L. monocytogenes* has become a paradigm for the study of intracellular pathogens. Similarly, the mechanisms that underlie its ability to persist in foodstuff and in the food manufacturing environment have been documented. However, the ecology of *L. monocytogenes* in outdoor environments is only partially understood. The objective of this review is to present the state of the art regarding extrinsic and intrinsic factors that shape the ecology of *L. monocytogenes* in the soil environment.

Understanding causal factors of agroecosystems invasion by human pathogens is required in a period of adaptation of farming practices to global changes in order to avoid emergence of health hazards related to increased circulation of pathogens.

DATA AVAILABLE ON THE OCCURRENCE OF *L. monocytogenes* IN SOIL

Several reports on the incidence of *L. monocytogenes* in soil are available (Table 1). The pioneering work by Welshimer presented the first evidence that soil is an environmental niche for *L. monocytogenes* and occurrence of the bacterium was observed in a third of the 12 sampled farms (Welshimer, 1960; Welshimer and Donker-Voet, 1971). This was further supported in the seventies by the work of Weis and Seeliger. These authors surveyed the occurrence of *L. monocytogenes* in 746 soil samples collected in Southern Germany. A total of 160 strains were isolated and the overall incidence of *L. monocytogenes* was 21.4% (Weis and Seeliger, 1975). In this study, variations from 8.4 to 44.0 in the percentage of positive samples were observed according to the type of culture in the field and the highest incidence was recorded for uncultivated fields and meadows. Higher prevalence in meadows and uncultivated fields (30.8%) compared to cultivated fields (8.3%) was confirmed later (Dowe et al., 1997). Similarly, in a recent survey of the distribution of the *Listeria* species in urban and natural environments in the US, while overall prevalence in soil was 19% in natural environments and 30% in urban environments, spatial variation of the prevalence of *Listeria* sp. was observed within each category (Sauders et al., 2012). Temporal variation of the detection of *L. monocytogenes* has been documented after sampling at the same site (Weis and Seeliger, 1975; Sauders et al., 2012). Moreover, prevalence differed significantly according to the season and category of environment. Indeed, it was highest during summer in natural environments but lowest at this time of the year in urban environments (Sauders et al., 2012). In another

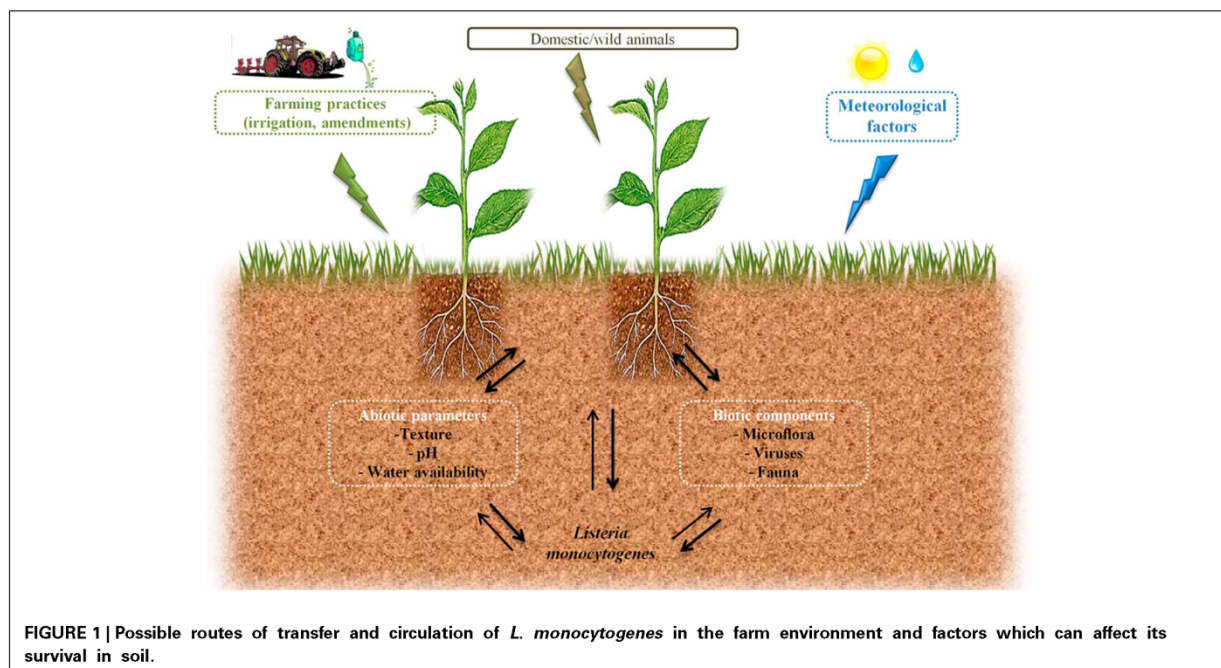


Table 1 | *Listeria monocytogenes* occurrence in soil and culture-based procedure used for its isolation.

References	Enrichment procedure	Enrichment broth	Condition of incubation	Percentage of soil detected as positive
Welshimer and Donker-Voet, 1971	2-step	BHI*	4°C, 3.5–5 months 37°C, 24 h	92% of farm samples** 86% of the non-agricultural soil samples**
Weis and Seeliger, 1975	1-step	Lehnert + acriflavin (10 µg/ml)	22°C, 7 days	From 5.2–51.4% according to vegetation cover
MacGowan et al., 1994	2-step	LEB***	30°C, 48 h, and 7 days	0.7% soils from urban origin
Garcia et al., 1996	2-step	Two-step enrichment		8.3% ewe's farmyard
Dowe et al., 1997	2-step	LEB/Frazer broth	30°C, 48 h/35°C, 24–48 h	8.3% in carrot fields 30.8% in adjacent meadows
Nightingale et al., 2004	1-step	LEB	30°C, 48 h	24% of samples from ruminant farms
Fox et al., 2009	1-step	LEB	30°C, 48 h	3% of soils from dairy farms
Sauders et al., 2012	1-step	LEB	30°C, 24–48 h	7.1% of soils collected from pristine field areas 0.4% of soils collected from pristine forest areas 10.7% of soils collected from urban environments
Locatelli et al., 2013a	2-step	LEB + modified LEB	37°C, 24–48 h	17% of field samples were positive in at least one of the three enrichment procedure
	2-step	Frazer broth	37°C, 48 h	
	1-step	Frazer broth	4°C, 2 months	
Strawn et al., 2013	1-step	LEB supplemented with a <i>Listeria</i> selective enrichment supplement	30°C, 24–48 h	9% of soils collected from fruit and vegetable farms

*Brain heart infusion, **These figures should be considered cautiously as taxonomy of the genus *Listeria* has drastically evolved since the 70ths, ****Listeria* enrichment broth.

report of a 3-year survey on fruit and vegetable farms, prevalence was higher in winter except during 1 year (Strawn et al., 2013) and correlation between season and occurrence is not a clear-cut. Incidence of *L. monocytogenes* in soil samples collected from small ruminant and cattle farms has also been recorded (Garcia et al., 1996; Nightingale et al., 2004; Fox et al., 2009).

In these surveys, detection always required selective enrichment. When available, the actual concentration of *L. monocytogenes* reported from soil samples is low (MacGowan et al., 1994; Dowe et al., 1997). It suggests that the population of *L. monocytogenes* in soil is generally low. This was confirmed in a French nationwide survey where a PCR assay was performed on a collection of 1232 soil DNA for the specific detection of *L. monocytogenes* (Locatelli et al., 2013a). All samples were below the detection limit of 10^4 g^{-1} of dry soil. Interestingly, a comparison of cultivation-based and molecular detection on a subset of 53 fresh soil samples showed that the incidence of culturable *L. monocytogenes* was 17% but only one of these samples was positive for the molecular detection of *L. monocytogenes* and its population was quantified at $2.88 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$ of dry soil (Locatelli et al., 2013a).

These surveys clearly demonstrate that soil is an environmental niche of *L. monocytogenes* but its population is generally low. Temporal and spatial variations of its occurrence point out that environmental factors drive the fate of *L. monocytogenes* in soil.

EDAPHIC FACTORS THAT AFFECT ITS SURVIVAL

Soil is an extremely complex and heterogeneous environment composed of minerals, organic matter, lacy plant roots and a

complex biota including microorganisms, viruses, mesofauna and macrofauna. All of these are constantly interacting and soil may be regarded as an environment under dynamic equilibrium (Kogel-Knabner et al., 2008). Soil is characterized by complex food webs influenced by below-ground and above-ground processes (Wardle, 2006). As such, deciphering environmental drivers that impact the occurrence of *L. monocytogenes* in soil is extremely hard as these drivers are interconnected.

One of the conclusions that can be drawn from the results of the surveys presented above is that the nature of the soil affects the occurrence of *L. monocytogenes*. However, in these reports, indications of the soil characteristics are coarse. This makes it difficult to extract significant information regarding the relation between soil's characteristics and the presence of *L. monocytogenes*.

Investigations on listerial population dynamics after inoculation of soil microcosms (Table 2) evidenced that water availability is critical to its survival (Welshimer, 1960; Picardbonnaud et al., 1989; Vanrenterghem et al., 1991; Dowe et al., 1997). The type of soil affects population dynamics. Sandy soil represents an environment less favorable for *L. monocytogenes* than sandy loam and clay loam soils (Dowe et al., 1997); lower survival in clay soil than in fertile garden soil was also reported (Welshimer, 1960). A drawback of these studies is that only one soil of each type was used. A statistical approach to the analysis of *L. monocytogenes* survival in soils was recently performed to circumvent this limitation of the published data (Locatelli et al., 2013b). Data on the survival of *L. monocytogenes* in 100 soil microcosms was analyzed in the light of a comprehensive and detailed characterization of the soil samples (Locatelli et al., 2013b). These results confirmed that survival is dependent of the type of soil. Survival up to 84 days was

Table 2 | *L. monocytogenes* population dynamics after inoculation of soil microcosms.

References	Soil type	Condition of incubation	Inoculum (CFU/g)	Population dynamics at the end of the experiment
NON-STERILIZED SOILS				
Welshimer, 1960	"Fertile"	30°C, 295 days	1.10^8	Decreased but still detectable throughout the incubation
	"Clay"			Approached the zero level around Day 195
Vanrenterghem et al., 1991	Sandy loam	15°C, 8 weeks	1.10^5	Intermittently detected during 6 weeks after incubation
Dowe et al., 1997	Clay loam, sandy loam and sandy	25–30°C, 32 days	1.10^2 1.10^6	Increase to 10^4 in clay loam and sandy loam—stable in sandy soil
Sidorenko et al., 2006	Brown podzolic Forest	20–22°C, 7 days	1.10^2	Decrease to 10^4 in clay loam and sandy loam—less than 10^3 in sandy soil
	Urban			Stable
McLaughlin et al., 2011	Forest	8°C, 14 days	1.10^6	Undetectable after Day 2
		25 and 30°C, 14 days		Increase to 10^4
Locatelli et al., 2013b	100 contrasted soils	20°C, 84 days	1.10^6	1.2 10^3 at the end of the experiment
				Sharp decrease and undetected by Day 8
				Declined with time
STERILIZED SOILS				
Dowe et al., 1997	Clay loam, sandy loam and sandy	25–30°C, 32 days	1.10^2 1.10^6	Increase to 10^5 in clay loam— 10^4 in sandy loam and sandy
				Stable at 10^4 in clay loam and sandy loam—down to 10^5 in sandy soil
McLaughlin et al., 2011	Forest	25°C, 14 days	1.10^6	Over 1 log increase within 2 days, then decrease down to 10^6
Piveteau et al., 2011	Loamy	25°C, 1 year	1.10^5	Over 3 log increase in 2 days then slow decline to 10^6 cfu.g^{-1}
Locatelli et al., 2013b	9 contrasted soil	20°C, 84 days	1.10^6	a rise (1 to 3 log) in 3 soils—Decline in 6 soils

observed in 71% of the soils tested while survival did not exceed 14 days in the rest of the soil microcosms. Variance partitioning explained this short-term survival by the soil chemical properties, especially the basic cation saturation ratio. The long-term survival could be related to the soil texture and especially clay content. The report by Locatelli et al. and others evidenced that the pH of the soil is a major driver of the fate of *L. monocytogenes* in soil (Weis and Seeliger, 1975; Sidorenko et al., 2006; McLaughlin et al., 2011; Locatelli et al., 2013b).

ROLE OF SOIL MICROFLORA, MICROFAUNA, MESOFAUNA AND MACROFAUNA

Soil is a rich and complex biotic environment that generates massive interest because of the immense diversity it harbors and the many services associated (Nannipieri et al., 2003; Decaens, 2010; Griffiths and Philippot, 2013). The impact of indigenous microorganisms on the fate of *L. monocytogenes* in soil has been addressed experimentally in microcosms. In these experiments, population dynamics of *L. monocytogenes* were compared in autoclaved and non-autoclaved soil microcosms. The results clearly demonstrated that autoclaving facilitates implantation of *L. monocytogenes* in soil as growth was observed in autoclaved soil while the population decreased in non-autoclaved soil (Welshimer, 1960; Botzler et al., 1974; Vanrenterghem et al., 1991; Dowe et al., 1997; McLaughlin et al., 2011). However, this effect of the soil microflora cannot be observed in soils with low pH as a decline of the listerial population was observed even in sterilized soils (Locatelli et al., 2013b). Interestingly, this antagonistic effect depends on the diversity and the structure of the soil microflora (Vivant et al., 2013). In this report, experimental erosion of diversity clearly showed that loss of biotic diversity resulted in a better survival of *L. monocytogenes* in soil.

In the complex food web of the soil environment, interactions of *L. monocytogenes* with microfauna, mesofauna and macrofauna are most likely and this assumption is supported by lab experiments.

Interaction of *L. monocytogenes* with bacteriophagous protozoans has been documented (Ly and Muller, 1990; Barker and Brown, 1994; Harf, 1994; Gourabathini et al., 2008). Once internalized by endocytosis, it can grow within the cytoplasm of *Acanthamoeba* sp. and *Tetrahymena pyriformis* and eventually causes lysis and death of the host within 8–14 days (Barker and Brown, 1994; Harf, 1994). In a study focused on *Glaucoma* sp. isolated from lettuce, *Tetrahymena* sp. isolated from spinach and *Tetrahymena* sp. isolated from soil, intracellular survival of *L. monocytogenes* was confirmed (Gourabathini et al., 2008). Finally, *L. monocytogenes* survives endocytosis by *Acanthamoeba castellanii*; this protozoan could actually enhance growth of the bacterium while feeding on various species of *Listeria* was not lethal to the protozoan (Zhou et al., 2007). These are indirect indications that protozoans can act as vectors of dispersion of *L. monocytogenes* in soil. However, other reports suggest that the ability of *L. monocytogenes* to survive after ingestion by protozoans may be strain and/or species specific as killing of *L. monocytogenes* by *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba lenticulata* has been reported (Akya et al., 2009, 2010).

Reports on the role of free living nematodes feeding on bacteria as vectors of dispersion of food-borne pathogens are available in the literature (Anderson et al., 2003, 2006; Caldwell et al., 2003; Gibbs et al., 2005; Thomsen et al., 2006; Forrester et al., 2007; Zhou et al., 2007; Guha et al., 2013). *Ceanorhabditis elegans* can feed on *L. monocytogenes*, moreover, in an agar plate assay, presence of live cells in the gut and excrement was confirmed and shedding of the pathogen was evidenced (Anderson et al., 2003, 2006; Caldwell et al., 2003; Guha et al., 2013). Interestingly, shedding by *Diploscapter* sp., a bacterivorous soil nematode, was observed in soil amended with composted turkey manure (Gibbs et al., 2005). Feeding on *L. monocytogenes* may have deleterious effects on *C. elegans* (Forrester et al., 2007) and killing of the nematode was demonstrated experimentally (Thomsen et al., 2006) but others did not report killing (Guha et al., 2013) and this remains an open question.

Information on interactions between *L. monocytogenes* and soil mesofauna and macrofauna is scarce (Kuzina et al., 2001; Mansfield et al., 2003; Sezen et al., 2004; Lapanje et al., 2010). However, these reports support the idea that several species of the soil meso- and macrofauna could act as reservoirs and vectors. Indeed, *Listeria* sp. was detected in the gut of the isopod *Porcelio scaber* (Lapanje et al., 2010) and in the gut of the Diptera *Anastrepha ludens* (Kuzina et al., 2001). Infection of another Diptera, *Drosophila melanogaster*, by *L. monocytogenes* has been demonstrated experimentally (Mansfield et al., 2003). In this work, intra-host multiplication was observed resulting in killing of the infected fruit flies within 6–8 days. *Listeria* sp. has been isolated from the bacterial flora of the Coleoptera *Agelastica alni* with a frequency of 18% (Sezen et al., 2004). Finally, *Listeria* sp. was detected in half of 10 wormfarms sampled but *L. monocytogenes* was not isolated in any of them (Smith, 2001). Considering the diversity of the soil fauna (Decaens, 2010), one can assume that many species probably interact with *L. monocytogenes*. Elucidation of these complex interactions in the soil food web would bring a new understanding of the ecology of this food-borne pathogen. Moreover, wild animals including mammals and birds must be considered as potential zoonotic reservoirs of the pathogen (Weis and Seeliger, 1975; Yoshida et al., 2000; Lyautey et al., 2007b) and may participate to its transfer to soil.

FARMING PRACTICES AND TRANSFER INTO THE SOIL (COMPOST, SEWAGE SLUDGES, RECLAIMED WASTE)

Telluric occurrence of *L. monocytogenes* and other food-borne pathogens raises health issues in cultivated fields and grazing pastures as soil may be a vector of pathogens to cultivated plants and farmed animals. Hence, cattle and small ruminants are reservoirs of *L. monocytogenes* (Garcia et al., 1996; Nightingale et al., 2004; Fox et al., 2009). There is a body of evidence that suggests that farming practices can directly impact on the circulation and implantation of *L. monocytogenes*.

Ensilage of contaminated crops may result in the increase of *L. monocytogenes* populations in the final feed that may become the vector of cattle listeriosis (Fenlon, 1985, 1986; Wiedmann et al., 1996).

Agricultural recycling of organic wastes without sanitation procedures is a route of transmission of *L. monocytogenes* to soil. Indeed, stored sewage sludges frequently contain *L. monocytogenes* at low levels (1–240 bacteria MPN g⁻¹ dry matter) and their agricultural use as fertilizer without sanitation procedure may facilitate its transfer and implantation into soil (Watkins and Sleath, 1981; Alghazali and Alazawi, 1990; De Luca et al., 1998; Garrec et al., 2003). Per hectare, spreading of one to two tons of sludge would bring around 10⁶–10⁸ *L. monocytogenes* per year (Garrec et al., 2003).

The presence of *L. monocytogenes* in the faeces of farm animals has been recognized (Fenlon et al., 1996; Nicholson et al., 2004; Nightingale et al., 2004). In a case-control study involving a total of 52 bovine, goat and sheep farms, the frequency of detection varied from 22 to 33% in bovine farms and from 3 to 18% in goat and sheep farms (Nightingale et al., 2004). Survival during storage of faecal wastes is limited to a few weeks but daily inputs in the storage facilities of the farmyard could maintain a constant load of viable *L. monocytogenes* (Vanrenterghem et al., 1991; Hutchison et al., 2005). Land spreading of these untreated wastes can contribute to the transmission of *L. monocytogenes* to soil. In an experiment of spreading of artificially contaminated faecal wastes on a grass pasture, 64–128 days were required until the listerial population declined to undetectable levels (Hutchison et al., 2005). In a separate experiment maximum survival period varied from 4 days to over 32 days after land application according to the type of waste (Nicholson et al., 2005). Delaying incorporation of faecal waste after land application on agricultural soils could result in a decline in the population of the pathogen (Hutchison et al., 2004). Under laboratory conditions, survival in bovine manure-amended soil varied from 21 to 43 days and depended on the dose and on the temperature of incubation (Jiang et al., 2004).

Survival up to 56 days was observed in a climatic chamber experiment designed to investigate the fate of several pathogens after spreading of anaerobic digestion residues on grass crops (Johansson et al., 2005).

Statistical integration of survey data gives interesting insights into the environmental parameters affecting the probability of occurrence of the pathogen. Ivanek et al. found a strong association between weather, soil properties and the probability to detect *Listeria* sp. in soil (Ivanek et al., 2009). In a recent 2 year long longitudinal study of the occurrence of food-borne pathogens in 5 fruit and vegetable farms, landscape and meteorological factors were associated to the frequency of positive samples (Strawn et al., 2013). Overall prevalence of *L. monocytogenes* was 15% while in soil, the frequency of detection was 9%. This survey was exploited to develop a classification tree model. This evidenced that temperature, proximity to surface water, roads/urban development and pasture/hay grass, but also soil-related parameters (available water storage, soil organic matter) were environmental and topographic factors of importance to explain detection of *L. monocytogenes* (Strawn et al., 2013). Interestingly, in this survey, the frequency of detection of *L. monocytogenes* was highest in water samples. The quality of water used for land irrigation is of concern and transfer of pathogens through poor quality irrigation water is likely (Steele and Odumeru, 2004; Selma et al.,

2007; Ijabadeniyi et al., 2011; Oliveira et al., 2011). Proximity to dairy farms is an environmental factor that influences detection of *L. monocytogenes* in watersheds (Sauders et al., 2006; Lyautey et al., 2007a). Wastewater treated effluents frequently carry *L. monocytogenes* (Watkins and Sleath, 1981; Alghazali and Alazawi, 1990; Steele and Odumeru, 2004; Paillard et al., 2005; Odjadjare et al., 2010; Moreno et al., 2011) with loads varying from 3 to 15 CFU.ml⁻¹ (Alghazali and Alazawi, 1990) to over 10³ CFU.ml⁻¹ (Odjadjare et al., 2010).

INTRINSIC FACTORS IN RELATION TO THE GENE CONTENT/TRANSCRIPTIONAL REGULATION

Sequencing of the genome of *L. monocytogenes* yields insights into traits that permit persistence of the pathogen into soil. The description of the genome of *L. monocytogenes* EGD-e, the first sequenced strain, highlighted features relevant to the ubiquity of this species (Glaser et al., 2001). Indeed, genes encoding transport proteins represent a high proportion of the genome (11.6% of the genome of *L. monocytogenes* EGD-e) 26% of them are related to the transport of carbohydrates by phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. It is thus equipped to have access to multiple carbon sources from varying environments. The proportion of regulatory genes is also high (7.3%). Such an extensive repertoire of regulatory genes is expected from a versatile bacterium that thrives in many habitats. The role of some of them has been studied extensively, especially PrfA and VirR because of their importance during infection of the mammal host.

At the moment, over 20 genomes of representatives of the genus *Listeria* are available (4 non *L. monocytogenes* and 24 *L. monocytogenes*) (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi?>). These are circular chromosomes ranging from 2.7 to 3.0 Mb in length. A characteristic of these genomes is their high degree of synteny (den Bakker et al., 2012, 2013). These comparative genomic analyses identified around 4400 genes in the pan-genome of *L. monocytogenes*. Among the putative protein coding genes (between 2330 and 2465 genes) about 80% are within the core genome. This rather high proportion of core genes relative to several other species is consistent with a stable species backbone and a limited accessory genome (from 323 to 753 genes per strain) (den Bakker et al., 2013). Interestingly, genes involved in transport and metabolic processes are overrepresented in both core and accessory genomes (den Bakker et al., 2012). *In silico* comparison of the representation of Clusters of Orthologous Groups within the genomes of the genus *Listeria*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* (Markowitz et al., 2012) illustrates the richness of all listerial genomes, similar to *Bacillus* genomes, in genes coding transport proteins and transcriptional regulators (Table 3). This could facilitate adaptation to various habitats, a trademark of the bacteria of the genus *Bacillus* and *Listeria*. Within the genus *Listeria*, the proportion of genes coding transport proteins, histidine kinases and transcriptional regulators are similar (Table 4). Noteworthy is the overrepresentation of PTS systems in both core and accessory genomes (Glaser et al., 2001; Doumith et al., 2004; Deng et al., 2010; den Bakker et al., 2013). Such a pool of carbohydrate transporters and the ability to metabolize an extended range of these carbon sources could

Table 3 | Median number of genes from functional categories transport, histidine kinase and transcriptional regulator across selected genomes.

Function	Distribution in taxonomic unit					
	Firmicutes	<i>Listeria</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
	N = 521	N = 28	N = 70	N = 48	N = 50	N = 90
Transport	257 (204)	320 (311)	466 (466)	208 (208)	266 (266)	216 (247)
Carbohydrate transport	20 (7)	23 (23)	32 (27)	13 (21)	7 (7)	17 (10)
Amino acid transport	43 (44)	40 (39)	80 (63)	48 (37)	44 (44)	41 (36)
PTS	27 (24)	86 (86)	29 (29)	28 (5)	25 (25)	41 (41)
Histidine kinase	15 (9)	15 (15)	50 (35)	8 (6)	15 (15)	9 (9)
Transcriptional regulator	89 (65)	142 (144)	204 (170)	70 (70)	77 (55)	68 (61)

N is the number of genomes considered for each taxonomic unit. The mode is presented in brackets.

Table 4 | Median number of genes from functional categories transport, histidine kinase and transcriptional regulator across the genus *Listeria* compared to *Bacillus subtilis* and Firmicutes.

Function	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Listeria</i> sp [*]	<i>L. monocytogenes</i>		
	N = 521	N = 12	N = 4	Lineage I	Lineage II	Lineage III
				N = 10	N = 10	N = 4
Transport	257	413 (371–650)**	315 (281–327)	320 (299–335)	330 (300–333)	311 (298–311)
Carbohydrate transport	20	44 (36–61)	23 (19–24)	23 (22–25)	23 (23–25)	22 (22–23)
Amino acid transport	44	62 (53–95)	38 (34–45)	39 (39–44)	40 (39–45)	39 (38–42)
PTS	27	29 (27–34)	85 (59–90)	83 (81–92)	87 (86–108)	80 (77–94)
Histidine kinase	15	37 (34–77)	15 (14–15)	15 (14–16)	16 (15–16)	15 (14–15)
Transcriptional regulator	89	181 (169–206)	132 (123–140)	142 (137–144)	146 (142–151)	139 (136–140)

N is the number of genomes considered for each taxonomic unit.

^{*}*L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*.

^{**}In brackets are the minimum and maximum numbers of genes found in the genome.

represent a fitness advantage under the control of selective pressure in the environment and *in vivo* (den Bakker et al., 2013). Under biotic conditions, the diversity of PTS systems and their possible functional redundancy could attenuate the efficacy of PTS-triggering bacteriocins (Diep et al., 2007; den Bakker et al., 2013) produced by neighboring bacteria (den Bakker et al., 2013).

Extrachromosomal DNA has been detected in many *L. monocytogenes* strains (Lebrun et al., 1992, 1994; McLauchlin et al., 1997; Lemaitre et al., 1998; Katharios-Lanwermyer et al., 2012). Overrepresentation of plasmids in strains from food and saprophytic environments in comparison to those from clinical cases was reported (Lebrun et al., 1992; McLauchlin et al., 1997; Kuenne et al., 2010). A number of diverse mobile genetic elements and genes involved in heavy metal resistance (cadmium, copper, arsenite) as well as multidrug efflux and oxidative stress response are generally found on plasmids isolated from representatives of the genus *Listeria* (Kuenne et al., 2010). The presence of these plasmids could assist survival in food processing environments. Recently, a unique type of plasmid was found in some strains of lineage IV responsible of caprine listeriosis outbreaks (den Bakker et al., 2012). Unlike what was discussed above, this plasmid does not carry genes involved in resistance to antibiotic or heavy metals but internalin-like genes that might facilitate invasion of the

caprine host. Still, the role of large plasmids in the ecology of *L. monocytogenes* is poorly understood although it is probably relevant to explain the fitness of isolates.

Information on the molecular mechanisms that underlie growth and persistence of *L. monocytogenes* in soil is scarce. Transcriptome analysis during adaptation to the soil environment showed that *L. monocytogenes* mobilized its repertoire of genes coding transporters (phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems and ABC transporters) and enzymes involved in catabolism of specific carbohydrates (β -glucosidases; chitinases) (Piveteau et al., 2011). It is consistent with the requirement to utilize the carbon, nitrogen and energy sources available in the soil in order to persist in this environment. Overrepresentation of genes from the SigmaB regulon was noticed (Piveteau et al., 2011). The role of SigmaB for the survival and adaptation of *L. monocytogenes* in soil has been demonstrated experimentally (Gorski et al., 2011). Indeed, SigmaB regulates the response and tolerance to most stresses in *L. monocytogenes*, including those that can be encountered in soil. A complex regulatory network underlies the ability of *L. monocytogenes* to thrive in diverse habitats and to respond efficiently to ever changing environmental conditions including transition from saprophytic to intracellular lifestyles (Chaturongakul et al., 2008).

As discussed above, *L. monocytogenes* has the ability to avoid predation by bacteriophagous protozoans and bacteriovorous nematodes. Expression of virulence factors could be a fitness advantage during interaction with soil protozoans and other soil dwelling organisms. For example, defective mutants of *actA* and *prfA* are impaired during infection of *Drosophila melanogaster* (Mansfield et al., 2003). Moreover, in this study, expression of *actA* was evidenced at 25°C in insect cells. Similarly, listeriolysin O (LLO) is involved in the interaction with *Tetrahymena pyriformis* and *hly* deficient mutants fail to cause mortality of the ciliate (Pushkareva and Ermolaeva, 2010). As such, expression of some of the identified virulence factors could contribute to the overall fitness of *L. monocytogenes* in the soil ecosystem.

BIODIVERSITY AND INCIDENCE IN SOIL

One of the trademarks of the species *L. monocytogenes* is the wide range of environments where it is found. However, the ecological significance of the systematic definition of bacterial species is not straightforward. The concept of ecotype aims at synthesizing systematic, ecology and evolution in a new paradigm for the understanding of the ecology of microorganisms (Cohan, 2006; Cohan and Koeppl, 2008). Ecotypes are defined as “the smallest groups that (i) show a history of coexistence as separate, ecologically distinct lineages, as inferred from community ecology (or an equivalent sequence-based approach) and (ii) show a prognosis for future coexistence, as inferred from the ecological distinctness of the groups in nature” (Cohan, 2006). Whether or not ecotypes exist in the species *L. monocytogenes* is an open question. The phylogenetic structure of *L. monocytogenes* is complex. Isolates are grouped in four lineages and major clonal complexes are recognized (Nadon et al., 2001; Ragon et al., 2008). These major clonal complexes are distributed worldwide (Chenal-Francisque et al., 2011). Interestingly, there is evidence that distribution of clones and serotypes differ among clinical, food and environmental isolates (Wiedmann et al., 1997; Gray et al., 2004; Ward et al., 2004; Chenal-Francisque et al., 2011). However, a limitation of these studies is that the collections of isolates that were analyzed are not fully representative of the complex ecology of members of the species *L. monocytogenes*. Ribotyping of farm animal isolates of *L. monocytogenes* identified several subtypes (Gudmundsdottir et al., 2004; Nightingale et al., 2004). In a case study, Nightingale et al. showed that the incidence of one of the ribotypes was higher in soil while others were preferentially associated with faecal samples and animals listeriosis (Nightingale et al., 2004). In two recent publications, the authors compared the diversity of *Listeria* strains isolated from soil, water and vegetation from natural areas of the state of New York (USA) and from urban soil, water, vegetation samples and several surfaces found in cities (Sauders et al., 2006, 2012). Evidence also pointed out to higher detection of specific subtypes in specific sample sites. These results are in favor of the existence of ecotypes. However, others report on the widespread distribution of PFGE types regardless of their origin (Fugett et al., 2007).

As proposed by Cohan (Cohan, 2006), defining such ecotypes will require a clear demonstration that the ecology of isolates of the various sequence clusters is actually distinct.

CONCLUSION

Soil is a complex ecosystem central to the function of the biosphere. Agricultural use of land may raise health issues. Indeed, soil may play a pivotal role in the transfer of Human pathogens to cultivated plants and farm animals and the subsequent contamination of foodstuff. As discussed in this review, *Listeria monocytogenes* is a human pathogen naturally present in soil. Indeed, intrinsic factors such as an extended repertoire of transport systems, especially PTS and transcriptional regulators underlie the ability of the members of this species to persist in the soil ecosystem. However, extrinsic factors affect their ability to survive in soil. These include edaphic parameters and the biotic environment which direct the fate of *L. monocytogenes*. The natural history of members of the species *L. monocytogenes* is complex, circulation of the pathogen between environments is still rather poorly understood and whether or not ecotypes exist remains an open question.

Considering their ability to persist in soil, it is rather difficult to predict how anthropogenic-driven changes could modify their circulation and incidence in the biosphere. In a period of rapid global changes, when agriculture faces major adaptation challenges, understanding the ecology of Human pathogens in agroecosystems is necessary to forecast how their circulation and incidence may be affected. It is indeed a prerequisite to reassess health hazards. As a matter of fact, *L. monocytogenes* should be considered as a useful model organism for this purpose.

REFERENCES

- Akya, A., Pinton, A., and Thomas, C. (2009). Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70, 20–29. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00736.x
- Akya, A., Pinton, A., and Thomas, C. (2010). *Listeria monocytogenes* does not survive ingestion by *Acanthamoeba polyphaga*. *Microbiology* 156, 809–818. doi: 10.1099/mic.0.031146-0
- Alghazali, M. R., and Alazawi, S. K. (1990). *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 642–647. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb01557.x
- Anderson, G. L., Caldwell, K. N., Beuchat, L. R., and Williams, P. L. (2003). Interaction of a free-living soil nematode, *Caenorhabditis elegans*, with surrogates of foodborne pathogenic bacteria. *J. Food Prot.* 66, 1543–1549.
- Anderson, G. L., Kenney, S. J., Millner, P. D., Beuchat, L. R., and Williams, P. L. (2006). Shedding of foodborne pathogens by *Caenorhabditis elegans* in compost-amended and unamended soil. *Food Microbiol.* 23, 146–153. doi: 10.1016/j.fm.2005.01.018
- Barker, J., and Brown, M. R. W. (1994). Trojan horses of the microbial world - protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140, 1253–1259. doi: 10.1099/00221287-140-6-1253
- Botzler, R. G., Cowan, A. B., and Wetzler, T. F. (1974). Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water. *J. Wildl. Dis.* 10, 204–212.
- Caldwell, K. N., Anderson, G. L., Williams, P. L., and Beuchat, L. R. (2003). Attraction of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, to foodborne pathogenic bacteria and its potential as a vector of *Salmonella* Poona for preharvest contamination of cantaloupe. *J. Food Prot.* 66, 1964–1971.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., and Boor, K. J. (2008). Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 16, 388–396. doi: 10.1016/j.tim.2008.05.006
- Chenal-Francisque, V., Lopez, J., Cantinelli, T., Caro, V., Tran, C., Lederq, A., et al. (2011). Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1110–1112. doi: 10.3201/eid1706.101778
- Cohan, F. M. (2006). Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1985–1996. doi: 10.1098/rstb.2006.1918

- Cohan, F. M., and Koeppl, A. F. (2008). The origins of ecological diversity in prokaryotes. *Curr Biol* 18, R1024–R1034. doi: 10.1016/j.cub.2008.09.014
- De Luca, G., Zanetti, F., Fateh-Moghadam, P., and Stampi, S. (1998). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in sewage sludge. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 201, 269–277.
- Decaens, T. (2010). Macroecological patterns in soil communities. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 19, 287–302. doi: 10.1111/j.1466-8238.2009.00517.x
- den Bakker, H. C., Bowen, B. M., Rodriguez-Rivera, L. D., and Wiedmann, M. (2012). FSL J1-208, a virulent uncommon phylogenetic lineage IV *Listeria monocytogenes* strain with a small chromosome size and a putative virulence plasmid carrying internalin-like genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1876–1889. doi: 10.1128/AEM.06969-11
- den Bakker, H. C., Desjardins, C. A., Griggs, J. E., Peters, J. E., Zeng, Q. D., Young, S. K., et al. (2013). Evolutionary dynamics of the accessory genome of *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE* 8:e67511. doi: 10.1371/journal.pone.0067511
- Deng, X., Philipp, A. M., Li, Z., Salzberg, S. L., and Zhang, W. (2010). Probing the pan-genome of *Listeria monocytogenes*: new insights into intraspecific niche expansion and genomic diversification. *BMC Genomics* 11:500. doi: 10.1186/1471-2164-11-500
- Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I. F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2384–2389. doi: 10.1073/pnas.0608775104
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., et al. (2004). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* 72, 1072–1083. doi: 10.1128/IAI.72.2.1072-1083.2004
- Dowe, M. J., Jackson, E. D., Mori, J. G., and Bell, C. R. (1997). *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *J. Food Prot.* 60, 1201–1207.
- Fenlon, D. R. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.* 59, 537–543. doi: 10.1111/j.1365-2672.1985.tb03357.x
- Fenlon, D. R. (1986). Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. *Vet. Rec.* 118, 240–242. doi: 10.1136/vr.118.9.240
- Fenlon, D. R., Wilson, J., and Donachie, W. (1996). The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 641–650. doi: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03559.x
- Forrester, S., Milillo, S. R., Hoose, W. A., Wiedmann, M., and Schwab, U. (2007). Evaluation of the pathogenicity of *Listeria* spp. in *Caenorhabditis elegans*. *Foodborne Pathog. Dis.* 4, 67–73. doi: 10.1089/fpd.2006.64
- Fox, E., O'Mahony, T., Clancy, M., Dempsey, R., O'Brien, M., and Jordan, K. (2009). *Listeria monocytogenes* in the Irish dairy farm environment. *J. Food Prot.* 72, 1450–1456.
- Fugett, E. B., Schoonmaker-Bopp, D., Dumas, N. B., Corby, J., and Wiedmann, M. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *J. Clin. Microbiol.* 45, 865–873. doi: 10.1128/JCM.01285-06
- García, E., DePaz, M., Rodríguez, J. L., Gaya, P., Medina, M., and Nunez, M. (1996). Exogenous sources of *Listeria* contamination in raw ewe's milk. *J. Food Prot.* 59, 950–954.
- Garrec, N., Picard-Bonnaud, F., and Pourcher, A. M. (2003). Occurrence of *Listeria* sp and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage tank on survival of *Listeria* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 275–283. doi: 10.1016/S0928-8244(02)00443-1
- Gibbs, D. S., Anderson, G. L., Beuchat, L. R., Carta, L. K., and Williams, P. L. (2005). Potential role of *Diploscapter* sp strain LKC25, a bacterivorous nematode from soil, as a vector of food-borne pathogenic bacteria to pre-harvest fruits and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2433–2437. doi: 10.1128/AEM.71.5.2433-2437.2005
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., et al. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849–852. doi: 10.1126/science.1063447
- Gorski, L., Duhe, J. M., and Flaherty, D. (2011). The Sigma B operon is a determinant of fitness for a *Listeria monocytogenes* serotype 4b strain in soil. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 699–704. doi: 10.1089/fpd.2010.0752
- Gourabathini, P., Brandl, M. T., Redding, K. S., Gunderson, J. H., and Berk, S. G. (2008). Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2518–2525. doi: 10.1128/AEM.02709-07
- Gray, M. J., Zadoks, R. N., Fortes, E. D., Dogan, B., Cai, S., Chen, Y., et al. (2004). *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5833–5841. doi: 10.1128/AEM.70.10.5833-5841.2004
- Griffiths, B. S., and Philippot, L. (2013). Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 112–129. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x
- Gudmundsdottir, K. B., Aalbak, B., Sigurdarson, S., and Gunnarsson, E. (2004). The diversity of *Listeria monocytogenes* strains from 10 Icelandic sheep farms. *J. Appl. Microbiol.* 96, 913–921. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02183.x
- Guha, S., Klees, M., Wang, X. X., Li, J., Dong, Y. Q., and Cao, M. (2013). Influence of planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* on *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Microbiol.* 195, 19–26. doi: 10.1007/s00203-012-0841-y
- Harf, C. (1994). Free living amoeba—interactions with environmental pathogenic bacteria. *Endocyt. Cell Res* 10, 167–183.
- Hutchison, M. L., Walters, L. D., Moore, A., Crookes, K. M., and Avery, S. M. (2004). Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5111–5118. doi: 10.1128/AEM.70.9.5111-5118.2004
- Hutchison, M. L., Walters, L. D., Moore, T., Thomas, D. J. L., and Avery, S. M. (2005). Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 691–696. doi: 10.1128/AEM.71.2.691-696.2005
- Ijabadeniyi, O. A., Debusho, L. K., Vanderlinde, M., and Buys, E. M. (2011). Irrigation water as a potential preharvest source of bacterial contamination of vegetables. *J. Food Saf.* 31, 452–461. doi: 10.1111/j.1745-4565.2011.00321.x
- Ivanek, R., Grohn, Y. T., Wells, M. T., Lembo, A. J., Saunders, B. D., and Wiedmann, M. (2009). Modeling of spatially referenced environmental and meteorological factors influencing the probability of *Listeria* species isolation from natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5893–5909. doi: 10.1128/AEM.02757-08
- Jiang, X. P., Islam, M., Morgan, J., and Doyle, M. P. (2004). Fate of *Listeria monocytogenes* in bovine manure-amended soil. *J. Food Protec.* 67, 1676–1681.
- Johansson, M., Emmoth, E., Salomonsson, A. C., and Albin, A. (2005). Potential risks when spreading anaerobic digestion residues on grass silage crops—survival of bacteria, moulds and viruses. *Grass Forage Sci.* 60, 175–185. doi: 10.1111/j.1365-2494.2005.00466.x
- Katharios-Lanwermyer, S., Rakic-Martinez, M., Elhanafi, D., Ratani, S., Tiedje, J. M., and Kathariou, S. (2012). Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria* spp. to other *Listeriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7549–7556. doi: 10.1128/AEM.02245-12
- Kogel-Knabner, I., Guggenberger, G., Kleber, M., Kandeler, E., Kalbitz, K., Scheu, S., et al. (2008). Organo-mineral associations in temperate soils: integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry. *J. Plant Nutr. Soil Sci.-Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* 171, 61–82. doi: 10.1002/jpln.200700048
- Kuenne, C., Voget, S., Pischmarov, J., Oehm, S., Goesmann, A., Daniel, R., et al. (2010). Comparative analysis of plasmids in the genus *Listeria*. *PLoS ONE* 5:e12511. doi: 10.1371/journal.pone.0012511
- Kuzina, L. V., Pelloquin, J. J., Vacek, D. C., and Miler, T. A. (2001). Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Curr. Microbiol.* 42, 290–294. doi: 10.1007/s002840110219
- Lapanje, A., Zrimec, A., Drobne, D., and Rupnik, M. (2010). Long-term Hg pollution-induced structural shifts of bacterial community in the terrestrial isopod (*Porcellio scaber*) gut. *Environ. Pollut.* 158, 3186–3193. doi: 10.1016/j.envpol.2010.07.001
- Lebrun, M., Audurier, A., and Cossart, P. (1994). Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *J. Bacteriol.* 176, 3040–3048.
- Lebrun, M., Loulergue, J., Chastusdanda, E., and Audurier, A. (1992). Plasmids in *Listeria monocytogenes* in relation to cadmium resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3183–3186.
- Lemaitre, J. P., Echchannaoui, H., Michaut, G., Divies, C., and Rousset, A. (1998). Plasmid-mediated resistance to antimicrobial agents among listeriae. *J. Food Protec.* 61, 1459–1464.

- Locatelli, A., Depret, G., Jolivet, C., Henry, S., Dequiedt, S., Piveteau, P., et al. (2013a). Nation-wide study of the occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils using culture-based and molecular detection methods. *J. Microbiol. Meth.* 93, 242–250. doi: 10.1016/j.mimet.2013.03.017
- Locatelli, A., Spor, A., Jolivet, C., Piveteau, P., and Hartmann, A. (2013b). Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS ONE* 8:e75969. doi: 10.1371/journal.pone.0075969
- Ly, T. M. C., and Muller, H. E. (1990). Interactions of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* and *Listeria innocua* with protozoans. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36, 143–150. doi: 10.2323/jgam.36.143
- Lyatey, E., Lapen, D. R., Wilkes, G., McCleary, K., Pagotto, F., Tyler, K., et al. (2007a). Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5401–5410. doi: 10.1128/AEM.00354-07
- Lyatey, E., Hartmann, A., Pagotto, F., Tyler, K., Lapen, D. R., Wilkes, G., et al. (2007b). Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. *Can. J. Microbiol.* 53, 1158–1167. doi: 10.1139/W07-084
- MacGowan, A. P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P. M., and Reeves, D. S. (1994). The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp in shop bought food stuffs, human feces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 325–334. doi: 10.1016/0168-1605(94)90062-0
- Mansfield, B. E., Dionne, M. S., Schneider, D. S., and Freitag, N. E. (2003). Exploration of host-pathogen interactions using *Listeria monocytogenes* and *Drosophila melanogaster*. *Cell. Microbiol.* 5, 901–911. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00329.x
- Markowitz, V. M., Chen, I.-M., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., et al. (2012). IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res.* 40, D115–D122. doi: 10.1093/nar/gkr1044
- McLauchlin, J., Hampton, M. D., Shah, S., Threlfall, E. J., Wieneke, A. A., and Curtis, G. D. W. (1997). Subtyping of *Listeria monocytogenes* on the basis of plasmid profiles and arsenic and cadmium susceptibility. *J. Appl. Microbiol.* 83, 381–388. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00238.x
- McLaughlin, H. P., Casey, P. G., Cotter, J., Gahan, C. G. M., and Hill, C. (2011). Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Arch. Microbiol.* 193, 775–785. doi: 10.1007/s00203-011-0716-7
- Moreno, Y., Ballesteros, L., Garcia-Hernandez, J., Santiago, P., Gonzalez, A., and Ferrus, M. A. (2011). Specific detection of viable *Listeria monocytogenes* in Spanish wastewater treatment plants by Fluorescent *In Situ* Hybridization and PCR. *Water Res.* 45, 4634–4640. doi: 10.1016/j.watres.2011.06.015
- Nadon, C. A., Woodward, D. L., Young, C., Rodgers, F. G., and Wiedmann, M. (2001). Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2704–2707. doi: 10.1128/JCM.39.7.2704-2707.2001
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., and Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655–670. doi: 10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x
- Nicholson, F. A., Chambers, B. J., Moore, A., Nicholson, R. J., and Hickman, G. (2004). Assessing and managing the risks of pathogen transfer from livestock manures into the food chain. *Water Environ. J.* 18, 155–160. doi: 10.1111/j.1747-6593.2004.tb00518.x
- Nicholson, F. A., Groves, S. J., and Chambers, B. J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour. Technol.* 96, 135–143. doi: 10.1016/j.biortech.2004.02.030
- Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., et al. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4458–4467. doi: 10.1128/AEM.70.8.4458-4467.2004
- Odjajare, E. E., Obi, L. C., and Okoh, A. I. (2010). Municipal wastewater effluents as a source of listerial pathogens in the aquatic milieu of the eastern Cape province of South Africa: a concern of public health importance. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 7, 2376–2394. doi: 10.3390/ijerph7052376
- Oliveira, M., Usall, J., Vinas, I., Solsona, C., and Abadias, M. (2011). Transfer of *Listeria innocua* from contaminated compost and irrigation water to lettuce leaves. *Food Microbiol.* 28, 590–596. doi: 10.1016/j.fm.2010.11.004
- Paillard, D., Dubois, W., Thiebaut, R., Nathier, F., Hoogland, E., Caumette, P., et al. (2005). Occurrence of *Listeria* spp. in effluents of French urban wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7562–7566. doi: 10.1128/AEM.71.11.7562-7566.2005
- Picardbonnaud, F., Cottin, J., and Carbonnelle, B. (1989). Persistence of *Listeria monocytogenes* in 3 sorts of soil. *Act. Microbiol. Hung.* 36, 263–267.
- Piveteau, P., Depret, G., Pivato, B., Garmyn, D., and Hartmann, A. (2011). Changes in gene expression during adaptation of *Listeria monocytogenes* to the soil environment. *PLoS ONE* 6:e24881. doi: 10.1371/journal.pone.0024881
- Pushkareva, V. I., and Ermolaeva, S. A. (2010). *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. *BMC Microbiol.* 10:26. doi: 10.1186/1471-2180-10-26
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenit, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., et al. (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens* 4:e1000146. doi: 10.1371/journal.ppat.1000146
- Sauders, B. D., Durak, M. Z., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo, A. J., et al. (2006). Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. *J. Food Protec.* 69, 93–105.
- Sauders, B. D., Overdeest, J., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo, A., et al. (2012). Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4420–4433. doi: 10.1128/AEM.00282-12
- Selma, M. V., Allende, A., Lopez-Galvez, F., Elizaquível, P., Aznar, R., and Gil, M. I. (2007). Potential microbial risk factors related to soil amendments and irrigation water of potato crops. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2542–2549. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03504.x
- Sezen, X., Demir, I., and Demirbag, Z. (2004). Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia* 59, 327–331.
- Sidorenko, M. L., Buzoleva, L. S., and Kostenkov, N. M. (2006). The effect of soil properties on the preservation and reproduction of *Listeria* and *Yersinia*. *Eurasian Soil Sci.* 39, 211–217. doi: 10.1134/S1064229306020128
- Smith, L. W. (2001). The incidence of potentially pathogenic bacteria in liquor from selected wormfarms. *Biol. Fert. Soils* 34, 215–217. doi: 10.1007/s003740100374
- Steele, M., and Odumeru, J. (2004). Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *J. Food Protec.* 67, 2839–2849.
- Strawn, L. K., Fortes, E. D., Bihn, E. A., Nightingale, K. K., Grohn, Y. T., Worobo, R. W., et al. (2013). Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 588–600. doi: 10.1128/AEM.02491-12
- Thomsen, L. E., Slutz, S. S., Tan, M. W., and Ingmer, H. (2006). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1700–1701. doi: 10.1128/AEM.72.2.1700-1701.2006
- Vanrenterghem, B., Huysman, F., Rygole, R., and Verstraete, W. (1991). Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural system. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 211–217. doi: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb04450.x
- Vivant, A. L., Garmyn, D., Maron, P. A., Nowak, V., and Piveteau, P. (2013). Microbial diversity and structure are drivers of the biological barrier effect against *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS ONE* 8:e76991. doi: 10.1371/journal.pone.0076991
- Ward, T. J., Gorski, L., Borucki, M. K., Mandrell, R. E., Hutchins, J., and Papedis, K. (2004). Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the prfA virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 186, 4994–5002. doi: 10.1128/JB.186.15.4994-5002.2004
- Wardle, D. A. (2006). The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecol. Lett.* 9, 870–886. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00931.x
- Watkins, J., and Sleath, K. P. (1981). Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water. *J. Appl. Bacteriol.* 50, 1–9. doi: 10.1111/j.1365-2672.1981.tb00865.x
- Weis, J., and Seeliger, H. P. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 30, 29–32.
- Welshimer, H. J. (1960). Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *J. Bacteriol.* 80, 316–320.
- Welshimer, H. J., and Donker-Voet, J. (1971). *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 21, 516–519.
- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Knorr, R., Bodis, M., Cole, E. M., McDowell, C. I., et al. (1996). Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1086–1090.
- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L., and Batt, C. A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three

distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.* 65, 2707–2716.

Yoshida, T., Sugimoto, T., Sato, M., and Hirai, K. (2000). Incidence of *Listeria monocytogenes* in Wild Animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 673–675. doi: 10.1292/jvms.62.673

Zhou, X. H., Elmoose, J., and Call, D. R. (2007). Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*). *Environ. Microbiol.* 9, 913–922. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01213.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 16 October 2013; paper pending published: 03 November 2013; accepted: 08 November 2013; published online: 28 November 2013.

Citation: Vivant A-L, Garmyn D and Piveteau P (2013) *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:87. doi: 10.3389/fcimb.2013.00087

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

Copyright © 2013 Vivant, Garmyn and Piveteau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Informations Supplémentaires

1. Informations supplémentaires du Chapitre 2

Table S1. Target genes and specific primers designed for real time PCR confirmation of the results.

Primers	Sequences (5' → 3')
AgrAF2	GCAAGCAGAAGAACGATTTCCAA
AgrAR2	CGCTGTCTCAAAAAACAAGATAT
AgrCF2	GGGGTCAATCGCAGGTTTTG
AgrCR2	CTTTAAGTTCGTTGGTTGCCGTA
Lmo0349F	TGCAGGTGGCTTTTTATTCC
Lmo0349R	CAACCATTTTTCCCCACATC
Lmo0477R	GGCGAATAAAGCAGTGGGTA
Lmo0477F	AACCACCCATTTTCCAATCTT
Lmo0914F	CATTTTACTCATTTGCGGATCAGGA
Lmo0914R	CCAAGTGCGGGCCTATTAATAAGTAAT
Lmo0917F	TGGAGTTGCTTGCTGAAATG
Lmo0917R	CCGCTTCATTTGGTTCAGTT
Lmo0943F	CGGAAGCCCATTCTCGACT
Lmo0943R	GTTACATTGTGCGCCTTCTTTGTCAG
Lmo2257F	GGGGATAAGACCCTATCATGG
Lmo2257R	TGCCATTCTATTGGAAGATGG
Lmo2467F	CCGGCAAGCCGTGTTTAT
Lmo2467R	AGGTCCACTTATTGGAAAACC
Lmo2711F	CCACTTGTCAAGGGCAGA
Lmo2711R	TGCTAGACGGGGAGGT

Table S2. List of entries with a different transcript level specifically in the $\Delta agrA$ mutant in sterilized soil extract.

Name or location ^(a,b)	Functional category	Fold change			
Entries with a significant higher transcript level					
<i>bvrC</i>	5.2	2.011	<i>lmo1192</i>	2.5	2.065
<i>cbiD</i>	2.5	2.094	<i>lmo1193</i>	2.5	2.084
<i>cbiE</i>	2.5	2.469	<i>lmo1196</i>	2.5	2.079
<i>cbiF</i>	2.5	2.331	<i>lmo1204</i>	2.5	2.609
<i>cbiG</i>	2.5	2.252	<i>lmo1205</i>	1.2	2.257
<i>cbiH</i>	2.5	2.567	<i>lmo2066</i>	6.0	2.401
<i>cbiQ</i>	1.2	2.140	<i>lmo2146</i>	3.5.2	2.733
<i>eutB</i>	2.1.1	2.207	<i>lmo2147</i>	5.2	2.568
<i>eutC</i>	2.1.1	2.070	<i>lmo2149</i>	5.2	2.573
<i>recS</i>	3.3	2.036	<i>lmo2257</i>	6.0	4.079
<i>lmo0024</i>	1.2	2.232	<i>lmo2499</i>	1.2	2.083
<i>lmo0257</i>	5.2	2.133	<i>lmo2780</i>	1.2	2.265
<i>lmo0342</i>	2.1.2	2.249	<i>lmo2818</i>	1.2	2.403
<i>lmo0343</i>	2.1.2	2.620	<i>lmo2819</i>	2.2	2.978
<i>lmo0344</i>	2.1.1	2.343	<i>lmo2828</i>	6.0	2.706
<i>lmo0345</i>	2.1.1	2.913	<i>lmo2833</i>	2.1.1	2.054
<i>lmo0346</i>	2.1.2	2.619	<i>lmo2834</i>	2.1.1	2.044
<i>lmo0347</i>	2.1.1	2.170	<i>lmo2835</i>	5.2	2.299
<i>lmo0349</i>	5.1	2.601	<i>lmo2836</i>	2.1.1	2.786
<i>lmo0350</i>	5.1	2.328	<i>lmo2837</i>	1.2	2.472
<i>lmo0351</i>	5.2	3.553	<i>lmo2838</i>	1.2	2.083
<i>lmo0372</i>	2.1.1	2.644	<i>lmo2839</i>	1.2	3.055
<i>lmo0422</i>	5.2	2.077	<i>lmo2840</i>	2.1.1	2.924
<i>lmo0423</i>	3.5.1	2.095	<i>lmo2841</i>	2.1.1	3.071
<i>lmo0643</i>	2.1.1	2.136	1208888-		
<i>lmo0681</i>	1.5	2.341	1209052		2.176
<i>lmo0682</i>	1.5	2.777	1216458-		
<i>lmo0683</i>	1.5	3.512	1216658		2.187
<i>lmo0684</i>	6.0	2.136	2233095-		
<i>lmo0687</i>	6.0	2.218	2233149		2.295
<i>lmo0735</i>	2.1.1	2.011	378320-378403		3.578
<i>lmo0786</i>	2.5	2.040	444889-445048		2.383
<i>lmo0848</i>	1.2	2.207	838622-838750		2.508
<i>lmo0859</i>	1.2	2.044	Entries with a significant lower transcript level		
<i>lmo0873</i>	3.5.2	2.169	<i>lys A</i>		2.167
<i>lmo0875</i>	1.2	2.226	<i>lmo0048</i>	1.3	6.578
<i>lmo0877</i>	2.1.1	2.017	<i>lmo0049</i>	6.0	16.704
<i>lmo1143</i>	2.1.1	2.183	<i>lmo0050</i>	1.3	8.749
<i>lmo1146</i>	5.2	2.312	<i>lmo0051</i>	3.5.2	6.430
<i>lmo1147</i>	2.5	2.089	<i>lmo0302</i>	6.0	3.157
<i>lmo1148</i>	2.5	2.063	<i>lmo0303</i>	6.0	2.436
<i>lmo1172</i>	3.5.2	2.402	<i>lmo0412</i>	6.0	2.197
<i>lmo1173</i>	1.3	2.584	<i>lmo0477</i>	5.2	15.991
<i>lmo1177</i>	2.1.1	2.023	<i>lmo0478</i>	5.2	6.139
<i>lmo1178</i>	2.1.1	2.202	<i>lmo0479</i>	5.2	5.114
<i>lmo1179</i>	2.1.1	2.037	<i>lmo1798</i>	5.2	11.712
<i>lmo1180</i>	2.1.1	2.192	<i>lmo1799</i>	1.8	9.713
<i>lmo1190</i>	6.0	2.831	<i>lmo2286</i>	4.3	2.113
			1172010-		
			1172075		2.221
			1486413-		
			1486479		2.127
			1788753-		2.062

1788811	
1867700-	
1867801	2.004
1869461-	
1869531	13.201
1933271-	
1933332	2.039
2007457-	
2007514	2.233
213669-213734	2.723
2398530-	
2398684	2.293
2408894-	
2408966	2.143
2452236-	
2452321	2.082
2489210-	
2489273	2.009
2583106-	
2583180	2.946
2611411-	
2611481	5.916
2773609-	
2773713	2.206
414761-414927	2.112
456937-457020	2.118
514382-514680	5.025
52535-52629	18.557
532254-532327	2.449
54673-54838	2.793
689826-689922	2.010
753329-753489	2.084

^(a) Bold entries form an operon, ^(b)

Coordinates indicate position of intergenic region on the *L. monocytogenes* genome-wide transcription start site (TSS) map (Wurtzel *et al.*, 2012).

Table S3. List of entries with a different transcript level specifically in the $\Delta agrA$ mutant in biotic soil extract.

Name or location ^(a,b)	Functional category	Fold change			
Entries with a significant higher transcript level					
<i>lmo0021</i>	1.2	4.465	<i>lmo0535</i>	3.5.2	2.499
<i>lmo0067</i>	3.8	3.004	<i>lmo0536</i>	2.1.1	4.211
<i>lmo0109</i>	3.5.2	3.425	<i>lmo0553</i>	5.2	3.568
<i>lmaD</i>	4.5	11.629	<i>hisH</i>	2.2	2.623
<i>lmo0130</i>	1.8	2.636	<i>hisG</i>	2.2	3.898
<i>lmo0133</i>	5.2	7.618	<i>lmo0579</i>	5.2	2.935
<i>lmo0161</i>	5.2	5.034	<i>lmo0592</i>	6.0	2.132
<i>lmo0178</i>	3.5.2	2.878	<i>lmo0596</i>	5.2	3.908
<i>lmo0181</i>	1.2	5.382	<i>lmo0612</i>	3.5.2	5.053
<i>ksgA</i>	3.6	6.070	<i>lmo0624</i>	5.2	2.353
<i>lmo0195</i>	1.2	2.141	<i>lmo0628</i>	5.1	3.051
<i>prfA</i>	3.5.2	2.722	<i>lmo0629</i>	5.2	5.201
<i>lmo0230</i>	5.2	3.177	<i>lmo0640</i>	2.1.1	2.386
<i>lmo0261</i>	2.1.1	3.242	<i>lmo0647</i>	6.0	2.814
<i>lmo0266</i>	3.5.2	2.145	<i>lmo0654</i>	6.0	2.650
<i>lmo0270</i>	6.0	2.133	<i>lmo0667</i>	1.2	4.137
<i>lmo0271</i>	2.1.1	4.010	<i>lmo0674</i>	6.0	3.020
<i>lmo0274</i>	5.1	2.146	<i>lmo0734</i>	3.5.2	3.859
<i>lmo0275</i>	1.10	2.474	<i>lmo0754</i>	4.2	2.165
<i>lmo0278</i>	1.2	5.941	<i>lmo0759</i>	5.2	2.257
<i>lmo0282</i>	5.2	5.232	<i>lmo0760</i>	5.2	2.916
<i>lmo0298</i>	1.2	6.397	<i>lmo0762</i>	4.5	4.009
<i>lmo0300</i>	2.1.1	4.067	<i>lmo0799</i>	5.2	2.356
<i>lmo0305</i>	2.2	2.276	<i>lmo0810</i>	1.2	2.712
<i>lmo0319</i>	2.1.1	2.033	<i>lmo0844</i>	5.2	2.100
<i>lmo0346</i>	2.1.2	4.848	<i>lmo0863</i>	6.0	2.440
<i>lmo0347</i>	2.1.1	13.554	<i>lmo0869</i>	5.2	4.556
<i>lmo0348</i>	2.1.1	9.578	<i>lmo0873</i>	3.5.2	2.465
<i>lmo0349</i>	5.1	21.357	<i>rsbX</i>	4.1	2.122
<i>lmo0351</i>	5.2	3.195	<i>lmo0914</i>	1.2	6.621
<i>lmo0384</i>	2.1.1	7.037	<i>lmo0915</i>	1.2	2.547
<i>lmo0390</i>	3.2	2.214	<i>lmo0917</i>	2.1.1	3.155
<i>lmo0391</i>	6.0	4.311	<i>lmo0918</i>	3.5.2	2.523
<i>lmo0392</i>	5.2	2.530	<i>lmo0923</i>	1.2	2.660
<i>lmo0399</i>	1.2	3.384	<i>lmo0925</i>	5.2	2.173
<i>lmo0400</i>	1.2	2.390	<i>lmo0955</i>	5.2	2.527
<i>lmo0401</i>	2.1.1	2.850	<i>lemA</i>	5.2	2.815
<i>lmo0405</i>	1.2	3.756	<i>lmo0965</i>	5.2	2.807
<i>lmo0407</i>	5.2	2.962	<i>lmo0992</i>	5.2	2.042
<i>lmo0419</i>	5.2	2.620	<i>lmo0993</i>	1.2	5.068
<i>lmo0426</i>	1.2	4.797	<i>lmo0994</i>	5.2	4.331
<i>lmo0466</i>		2.959	<i>clpE</i>	4.1	4.808
<i>lmo0471</i>	5.2	2.136	<i>lmo1006</i>	2.2	4.417
<i>lmo0492</i>	3.5.2	3.152	<i>lmo1018</i>	4.2	2.668
<i>lmo0512</i>	6.0	4.229	<i>lmo1044</i>	2.5	2.871
<i>lmo0517</i>	2.1.2	4.778	<i>lmo1048</i>	2.5	2.473
<i>lmo0530</i>	5.2	2.534	<i>lmo1057</i>	2.1.1	4.705
<i>lmo0533</i>	5.2	2.586	<i>lmo1058</i>	5.2	3.378
			<i>lmo1059</i>	6.0	2.191
			<i>lmo1086</i>	2.1	2.177
			<i>tagB</i>	1.1	3.039
			<i>tagD</i>	1.1	2.399
			<i>lmo1138</i>	4.1	2.935

Informations Supplémentaires

<i>lmo1177</i>	2.1.1	2.121	<i>ctaB</i>	2.5	2.431
<i>lmo1258</i>	5.2	2.389	<i>lmo2066</i>	6.0	5.771
<i>lmo1262</i>	3.5.2	3.513	<i>lmo2110</i>	2.1.1	10.020
<i>lmo1300</i>	1.2	2.318	<i>lmo2121</i>	2.1.1	2.624
<i>lmo1301</i>	5.2	2.497	<i>lmo2123</i>	1.2	8.698
<i>lmo1302</i>	3.5.2	5.739	<i>lmo2124</i>	1.2	13.332
<i>lmo1303</i>	5.2	4.645	<i>lmo2125</i>	1.2	7.342
<i>lmo1304</i>	5.2	2.214	<i>lmo2143</i>	2.1.1	3.656
<i>polC</i>	3.1	2.321	<i>lmo2154</i>	2.3	2.146
<i>lmo1332</i>	5.2	3.294	<i>lmo2159</i>	1.4	9.932
<i>lmo1349</i>	2.2	3.426	<i>lmo2166</i>	5.1	2.722
<i>lmo1363</i>	2.4	3.575	<i>lmo2174</i>	5.2	2.252
<i>lmo1382</i>	5.2	2.974	<i>mecA</i>	1.10	2.316
<i>lmo1383</i>	5.2	2.114	<i>lmo2200</i>	3.5.2	2.379
<i>lmo1400</i>	4.2	2.685	<i>clpB</i>	4.1	2.223
<i>lmo1433</i>	4.1	2.509	<i>lmo2216</i>	5.2	3.130
<i>lmo1434</i>	5.2	2.572	<i>lmo2221</i>	5.2	4.669
<i>lmo1503</i>	5.2	3.426	<i>lmo2222</i>	5.2	3.298
<i>lmo1508</i>	1.3	2.906	<i>lmo2259</i>	1.2	3.239
<i>lmo1526</i>	5.2	2.225	<i>lmo2265</i>	5.2	3.245
<i>dnaI</i>	3.1	4.002	<i>addB</i>	3.3	2.025
<i>polA</i>	3.1	2.332	<i>lmo2274</i>	4.3	4.976
<i>lmo1568</i>	5.2	2.247	<i>lmo2280</i>	4.3	2.126
<i>lmo1580</i>	5.2	2.756	<i>lmo2301</i>	4.3	2.824
<i>daaA</i>	2.2	2.986	<i>lmo2302</i>	6.0	3.658
<i>lmo1621</i>	3.2	3.008	<i>lmo2307</i>	6.0	2.273
<i>lmo1626</i>	6.0	2.457	<i>lmo2314</i>	6.0	2.448
<i>lmo1639</i>	3.2	2.990	<i>lmo2317</i>	4.3	2.694
<i>lmo1684</i>	2.1.1	2.377	<i>lmo2318</i>	5.2	2.708
<i>lmo1704</i>	5.2	3.688	<i>lmo2320</i>	6.0	3.066
<i>lmo1719</i>	1.2	2.375	<i>lmo2321</i>		3.840
<i>lmo1720</i>	1.2	2.267	<i>lmo2323</i>	4.3	2.008
<i>lmo1726</i>	5.2	2.031	<i>lmo2327</i>	6.0	3.733
<i>lmo1727</i>	3.5.2	4.388	<i>lmo2328</i>	3.5.2	4.647
<i>lmo1728</i>	2.1.1	2.622	<i>lmo2330</i>	4.3	3.271
<i>lmo1729</i>	2.1.1	3.260	<i>lmo2344</i>	5.2	3.779
<i>lmo1730</i>	1.2	2.437	<i>lmo2360</i>	5.2	2.004
<i>lmo1739</i>	1.2	6.265	<i>lmo2368</i>	5.2	2.580
<i>lmo1789</i>	1.4	5.159	<i>lmo2369</i>	4.1	2.535
<i>lmo1791</i>	6.0	2.359	<i>lmo2387</i>	5.2	3.905
<i>lmo1794</i>	5.2	3.411	<i>lmo2391</i>	5.2	2.515
<i>lmo1796</i>	5.2	2.548	<i>lmo2399</i>	5.2	2.829
<i>lmo1866</i>	5.2	2.702	<i>lmo2405</i>	5.2	5.774
<i>lmo1913</i>	5.2	3.358	<i>lmo2425</i>	2.2	5.005
<i>lmo1920</i>	5.2	4.197	<i>lmo2427</i>	1.7	2.254
<i>lmo1935</i>	3.8	2.807	<i>lmo2432</i>	6.0	3.883
<i>recS</i>	3.3	3.190	<i>galE</i>	2.1.1	3.448
<i>lmo1964</i>	1.2	2.716	<i>lmo2484</i>	5.2	2.322
<i>lmo1975</i>	3.2	2.200	<i>lmo2490</i>	5.2	2.333
<i>lmo1980</i>	6.0	2.432	<i>lmo2511</i>	5.2	2.963
<i>lmo1996</i>	3.5.2	3.984	<i>lmo2571</i>	2.5	4.284
<i>lmo1999</i>	2.1.1	7.413	<i>lmo2572</i>	2.5	4.404
<i>lmo2002</i>	1.2	2.674	<i>lmo2583</i>	3.5.2	3.153
<i>lmo2004</i>	3.5.2	4.034	<i>lmo2602</i>	5.2	2.629
<i>lmo2008</i>	1.2	2.662	<i>lmo2603</i>	5.2	2.353
<i>lmo2009</i>	1.2	2.666	<i>lmo2648</i>	2.4	2.398
<i>lmo2028</i>	5.2	3.198	<i>lmo2649</i>	1.2	2.288
<i>lmo2050</i>	3.2	2.727	<i>lmo2650</i>	1.2	2.486

Informations Supplémentaires

<i>lmo2651</i>	1.2	4.294	1346950	
<i>lmo2652</i>	3.5.2	2.597	1386816-	
<i>lmo2658</i>	2.2	2.485	1387013	3.331
<i>lmo2660</i>	2.1.1	3.241	1405860-	
<i>lmo2663</i>	2.1.1	3.611	1405944	8.020
<i>lmo2665</i>	1.2	18.030	1414720-	
<i>lmo2666</i>	1.2	6.938	1415151	3.398
<i>lmo2667</i>	1.2	2.492	1426466-	
<i>lmo2668</i>	3.5.2	4.185	1426765	2.514
<i>lmo2672</i>	3.5.2	2.054	1464157-	
<i>lmo2673</i>	5.2	2.724	1464208	3.003
<i>lmo2674</i>	2.1.1	3.467	1472851-	
<i>lmo2675</i>	6.0	4.544	1472979	3.125
<i>lmo2679</i>	1.3	3.070	1473589-	
<i>lmo2683</i>	1.2	6.686	1473888	4.109
<i>lmo2701</i>	5.2	3.087	147765-147883	4.314
<i>lmo2703</i>	5.2	2.185	1487605-	
<i>lmo2705</i>	5.2	2.033	1487698	2.985
<i>lmo2706</i>	6.0	4.390	1502055-	
<i>lmo2707</i>	6.0	5.378	1502251	4.513
<i>lmo2713</i>	1.8	3.772	1505171-	
<i>lmo2714</i>	1.8	5.316	1505311	3.280
<i>lmo2733</i>	1.2	6.300	1561883-	
<i>lmo2739</i>	3.5.2	7.523	1561977	4.326
<i>lmo2762</i>	1.2	5.860	1564243-	
<i>lmo2772</i>	1.2	2.949	1564342	3.720
<i>lmo2773</i>	3.5.2	7.546	1600279-	
<i>lmo2780</i>	1.2	8.010	1600355	18.719
<i>lmo2781</i>	2.1.1	5.367	1654580-	
<i>lmo2782</i>	1.2	15.507	1654690	2.753
<i>lmo2800</i>	2.1.1	4.361	1663983-	
<i>lmo2801</i>	2.1.1	3.331	1664056	15.850
<i>lmo2824</i>	2.1.1	8.448	1674-1866	3.109
<i>lmo2845</i>	1.2	2.448	167944-168004	3.654
<i>lmo2851</i>	3.5.2	3.881	1680561-	
1040625-			1680643	4.142
1040671		4.446	1697992-	
1049139-			1698164	2.280
1049272		2.321	1698654-	
1071368-			1698733	8.480
1071461		2.446	1748710-	
1078584-			1748791	3.731
1079111		2.871	1752941-	
1092055-			1753094	4.423
1092254		3.894	1767295-	
1121023-			1767358	4.746
1121097		4.282	1767740-	
1159831-			1767845	3.154
1160219		5.277	1781127-	
122521-122797		3.362	1781195	4.775
123713-123759		2.089	1788753-	
1259450-			1788811	2.859
1259529		8.720	1796926-	
1320376-			1796986	2.913
1320607		2.532	1857773-	
1331348-			1857855	2.706
1331438		3.374	1998038-	
1346847-		5.187	1998167	4.855
			2004312-	3.378

Informations Supplémentaires

2004514		2395479-	
2015739-		2395585	7.310
2015818	2.606	2396332-	
2016539-		2396453	4.517
2016857	2.491	2398085-	
2020298-		2398286	10.254
2020737	3.874	2445584-	
2058419-		2445684	2.530
2058515	2.155	2466626-	
2067757-		2466712	3.196
2067886	6.272	2501151-	
2068898-		2501305	11.587
2068976	2.343	2501471-	
2069649-		2501602	2.524
2069709	12.004	2506371-	
2091455-		2506493	4.374
2091697	2.104	2523577-	
2100752-		2523834	2.852
2100844	3.875	2524912-	
2110786-		2525093	2.922
2110908	5.929	2536269-	
2113668-		2536346	5.408
2113733	3.054	2549355-	
213669-213734	2.045	2549461	3.951
2138758-		2577547-	
2138903	2.398	2577695	4.044
2207017-		2590608-	
2207102	4.508	2590801	3.692
2208363-		2594524-	
2208575	6.728	2594907	2.309
2225945-		2624879-	
2226532	3.457	2624979	2.327
2236789-		2689324-	
2236843	4.588	2689441	16.886
223877-224026	2.791	2721490-	
2242283-		2721558	5.902
2242375	3.234	2740334-	
226509-226853	2.851	2740389	12.679
2341790-		2757912-	
2341864	3.852	2758045	8.369
234338-234413	5.701	2769274-	
2348152-		2769380	3.789
2348230	2.203	2774566-	
2348540-		2774683	3.057
2348603	3.812	2777389-	
2351301-		2777496	2.126
2351383	5.461	2782298-	
2360185-		2782738	2.337
2360434	6.345	280956-281020	4.841
2386681-		2831880-	
2387045	4.775	2832057	2.972
2386715-		2843868-	
2386992	2.676	2843913	5.371
2387664-		2848336-	
2387791	5.094	2848405	2.125
2389388-		2856283-	
2389490	2.589	2856378	3.597
2394985-		2888216-	
2395289	4.911	2888638	2.923

290522-290592	3.656	<i>lmo0093</i>	1.4	2.426
2917267-		<i>lmo0094</i>	6.0	2.640
2917388	4.858	<i>lmo0095</i>	5.1	2.697
2932474-		<i>lmo0097</i>	1.2	2.068
2932608	3.014	<i>lmo0098</i>	1.2	2.010
316776-316872	3.826	<i>lmo0102</i>	5.2	4.024
324006-324103	10.543	<i>lmo0104</i>	6.0	2.501
339088-339269	2.369	<i>lmo0125</i>	6.0	2.015
369758-370031	2.801	<i>lmo0126</i>	6.0	2.165
378320-378403	30.415	<i>lmo0141</i>	6.0	2.248
396112-396207	7.431	<i>lmo0143</i>	6.0	2.424
402540-402640	2.772	<i>lmo0144</i>	6.0	2.753
412364-412456	7.621	<i>lmo0145</i>	6.0	2.513
441571-441621	3.486	<i>lmo0146</i>	6.0	2.156
49307-49584	5.518	<i>lmo0147</i>	6.0	2.506
512209-512290	8.974	<i>lmo0148</i>	5.1	2.567
526689-526753	3.069	<i>lmo0153</i>	1.2	4.357
551347-551466	3.351	<i>lmo0154</i>	1.2	2.088
593439-593527	3.826	<i>lmo0168</i>	3.5.2	2.847
608481-608556	4.180	<i>lmo0172</i>	4.4	2.656
669362-669422	8.048	<i>plcA</i>	2.4	4.020
680297-680359	9.250	<i>actA</i>	1.8	2.162
689826-689922	3.225	<i>lmo0206</i>	6.0	3.018
75229-75341	11.711	<i>rplK</i>	3.7.1	2.778
780297-780376	2.963	<i>lmo0255</i>	5.2	2.013
786993-787319	4.516	<i>inlG</i>	1.8	2.471
788577-788641	3.834	<i>inlE</i>	1.8	3.434
807690-807975	2.087	<i>lmo0296</i>	6.0	3.194
838622-838750	13.146	<i>lmo0307</i>	6.0	2.347
926859-927109	2.606	<i>lmo0308</i>		2.669
953770-953841	3.109	<i>lmo0309</i>	5.2	2.495
966137-966244	4.485	<i>lmo0320</i>	1.8	2.516
997558-997794	2.763	<i>lmo0324</i>	6.0	3.628
Entries with a significant lower transcript level		<i>lmo0326</i>	3.5.2	2.867
<i>lmo0017</i>	1.1	<i>lmo0328</i>	5.1	2.971
<i>lmo0032</i>	3.5.2	<i>lmo0330</i>	4.4	2.499
<i>lmo0033</i>	2.1.1	<i>lmo0357</i>	1.2	2.066
<i>lmo0034</i>	1.2	<i>lmo0361</i>	5.2	2.409
<i>lmo0042</i>	5.2	<i>lmo0363</i>	2.2	5.595
<i>rpsR</i>	3.7.1	<i>lmo0365</i>	5.2	5.917
<i>lmo0048</i>	1.3	<i>lmo0366</i>	1.2	2.335
<i>lmo0049</i>	6.0	<i>lmo0367</i>	5.2	2.603
<i>lmo0050</i>	1.3	<i>lmo0371</i>	3.5.2	2.146
<i>lmo0051</i>	3.5.2	<i>lmo0374</i>	1.2	3.045
<i>lmo0056</i>	5.2	<i>lmo0378</i>	6.0	2.715
<i>lmo0057</i>	5.2	<i>lmo0379</i>	6.0	2.326
<i>lmo0058</i>	6.0	<i>lmo0380</i>	6.0	2.241
<i>lmo0060</i>	5.2	<i>lmo0395</i>	4.2	5.203
<i>lmo0061</i>	5.2	<i>lmo0412</i>	6.0	6.220
<i>lmo0062</i>	6.0	<i>lmo0418</i>	6.0	3.444
<i>lmo0063</i>	6.0	<i>lmo0436</i>	5.2	2.082
<i>lmo0065</i>	6.0	<i>lmo0442</i>	6.0	2.103
<i>lmo0070</i>	6.0	<i>lmo0447</i>	2.2	3.087
<i>lmo0073</i>	5.1	<i>lmo0448</i>	1.2	2.993
<i>lmo0074</i>	5.1	<i>lmo0450</i>	5.2	3.910
<i>lmo0085</i>	5.1	<i>lmo0451</i>	6.0	2.181
<i>lmo0087</i>	5.1	<i>lmo0460</i>	1.8	2.188
		<i>lmo0461</i>	6.0	2.552

Informations Supplémentaires

<i>lmo0467</i>		2.154	<i>lmo1037</i>	5.2	2.147
<i>lmo0478</i>	5.2	3.502	<i>lmo1056</i>	6.0	2.011
<i>lmo0479</i>	5.2	2.151	<i>lmo1062</i>	1.2	2.648
<i>lmo0518</i>	5.2	2.613	<i>lmo1063</i>	1.2	3.770
<i>lmo0550</i>	1.8	3.189	<i>lmo1067</i>	3.7.4	4.546
<i>lmo0559</i>	5.2	2.788	<i>lmo1074</i>	1.1	3.602
<i>lmo0586</i>	1.8	2.705	<i>lmo1079</i>	5.2	4.845
<i>lmo0609</i>	4.1	2.636	<i>lmo1098</i>	4.4	2.554
<i>lmo0635</i>	5.2	2.604	<i>lmo1101</i>	1.6	2.560
<i>lmo0638</i>	6.0	2.324	<i>lmo1102</i>	4.2	2.276
<i>lmo0659</i>	3.5.2	2.747	<i>lmo1103</i>	4.4	2.192
<i>lmo0660</i>	4.4	2.594	<i>lmo1104</i>	1.1	3.652
<i>lmo0661</i>	5.2	2.284	<i>lmo1106</i>	4.4	2.633
<i>lmo0672</i>	5.2	3.039	<i>lmo1107</i>	4.4	2.970
<i>lmo0678</i>	1.5	4.673	<i>lmo1108</i>	4.4	2.921
<i>lmo0684</i>	6.0	2.831	<i>lmo1109</i>	4.4	4.374
<i>lmo0685</i>	1.5	2.654	<i>lmo1111</i>	4.4	2.232
<i>lmo0730</i>	6.0	2.227	<i>lmo1121</i>	6.0	2.344
<i>lmo0741</i>	3.5.2	2.307	<i>lmo1131</i>	1.2	2.509
<i>lmo0743</i>	6.0	3.172	<i>lmo1133</i>	5.2	2.758
<i>lmo0744</i>	1.2	3.831	<i>lmo1136</i>	1.8	2.282
<i>lmo0746</i>	6.0	2.575	<i>lmo1151</i>	2.1.1	2.700
<i>lmo0747</i>	6.0	2.354	<i>lmo1153</i>	2.1	5.432
<i>lmo0753</i>	3.5.2	2.376	<i>glpF</i>	1.2	4.049
<i>lmo0757</i>	5.2	2.475	<i>cobD</i>	2.5	2.805
<i>lmo0767</i>	1.2	3.267	<i>pduQ</i>	2.1.1	3.764
<i>lmo0772</i>	3.5.2	2.204	<i>eutA</i>	2.1.1	3.231
<i>lmo0778</i>	6.0	2.769	<i>eutB</i>	2.1.1	2.049
<i>lmo0780</i>	6.0	2.136	<i>lmo1183</i>	6.0	2.575
<i>lmo0783</i>	1.2	2.729	<i>lmo1187</i>	2.1.1	2.710
<i>lmo0788</i>	5.2	2.744	<i>lmo1210</i>	5.2	4.093
<i>lmo0795</i>	5.2	3.454	<i>lmo1219</i>	6.0	2.002
<i>lmo0801</i>	1.8	2.032	<i>lmo1250</i>	1.2	5.276
<i>lmo0807</i>	1.2	4.179	<i>lmo1251</i>	3.5.2	2.856
<i>lmo0808</i>	1.2	2.330	<i>lmo1263</i>	3.5.2	2.596
<i>lmo0812</i>	5.2	2.012	<i>lmo1264</i>	6.0	2.160
<i>lmo0832</i>	4.4	2.317	<i>lmo1274</i>	3.8	2.017
<i>lmo0835</i>	1.8	3.970	<i>codV</i>	3.3	2.026
<i>uhpT</i>	1.2	2.401	<i>lmo1289</i>	1.8	2.113
<i>lmo0843</i>	5.2	2.184	<i>glnR</i>	3.5.2	5.479
<i>lmo0849</i>	1.1	2.898	<i>lmo1306</i>	5.2	2.260
<i>lmo0850</i>	6.0	2.455	<i>lmo1312</i>	6.0	3.272
<i>lmo0865</i>	2.1.1	2.294	<i>smbA</i>	2.3	3.063
<i>lmo0866</i>	3.6	3.999	<i>lmo1317</i>	2.4	3.491
<i>lmo0872</i>	1.2	2.347	<i>pnpA</i>	2.3	4.295
<i>lmo0912</i>	1.2	2.793	<i>lmo1341</i>	1.10	2.510
<i>lmo0934</i>	5.2	2.393	<i>lmo1342</i>	1.10	2.668
<i>lmo0937</i>	6.0	2.264	<i>lmo1343</i>	1.10	2.617
dltD	1.1	3.482	<i>lmo1344</i>	1.10	2.225
dltC	1.1	4.383	<i>comGB</i>	1.10	2.396
dltB	1.1	2.784	<i>pflB</i>	2.1.1	2.954
dltA	1.1	5.171	<i>lmo1416</i>	5.2	2.625
<i>lmo0976</i>	5.2	2.846	<i>lmo1431</i>	1.2	5.764
<i>lmo1001</i>	5.2	2.361	<i>lmo1440</i>	5.2	2.891
<i>lmo1007</i>	6.0	2.959	<i>lmo1444</i>	1.6	2.878
<i>gbuB</i>	1.2	5.328	<i>lmo1478</i>	3.5.2	2.741
<i>gbuC</i>	1.2	2.241	<i>comEC</i>	1.10	2.137
<i>lmo1031</i>	5.2	3.742	<i>lmo1496</i>	3.5.3	2.224

Informations Supplémentaires

<i>lmo1505</i>	1.2	2.638	<i>lmo2197</i>	6.0	2.724
<i>lmo1506</i>	1.2	2.037	<i>lmo2203</i>	1.8	2.689
<i>lmo1513</i>	2.5	2.355	<i>lmo2207</i>	5.2	2.084
<i>lmo1518</i>	6.0	2.726	<i>lmo2210</i>	6.0	2.505
<i>lmo1522</i>	5.2	2.776	<i>hemE</i>	2.5	2.643
<i>lmo1525</i>	3.3	2.186	<i>lmo2223</i>	5.2	2.481
<i>lmo1530</i>	3.6	2.467	<i>lmo2236</i>	2.1.1	2.793
<i>lmo1541</i>	5.2	2.429	<i>lmo2237</i>	1.2	3.042
<i>mreB</i>	1.1	2.561	<i>lmo2238</i>	1.2	2.601
<i>lmo1549</i>	3.2	2.058	<i>lmo2242</i>	3.2	2.579
<i>comC</i>	1.10	2.684	<i>lmo2254</i>	5.2	3.295
<i>accA</i>	2.4	2.690	<i>lmo2258</i>	6.0	2.388
<i>ackA</i>	2.1.1	2.759	<i>lmo2290</i>	4.3	2.393
<i>lmo1582</i>	3.2	4.213	<i>lmo2291</i>	4.3	2.108
<i>lmo1617</i>	1.2	5.371	<i>lmo2293</i>	4.3	2.053
<i>lmo1634</i>	2.1.1	2.793	<i>comK</i>	3.5.2	2.001
<i>lmo1656</i>	5.2	2.501	<i>fruA</i>	1.2	4.307
<i>lmo1659</i>	6.0	2.533	<i>fruB</i>	2.1.1	6.477
<i>metK</i>	2.2	3.026	<i>lmo2337</i>	3.5.2	4.839
<i>lmo1668</i>	5.2	2.407	<i>lmo2352</i>	3.5.2	3.171
<i>lmo1700</i>	6.0	2.147	<i>lmo2365</i>	3.5.2	3.003
<i>lmo1714</i>	5.2	2.118	<i>lmo2375</i>	6.0	2.072
<i>lmo1715</i>	5.2	2.283	<i>lmo2377</i>	1.2	2.312
<i>lmo1779</i>	6.0	2.256	<i>lmo2394</i>	5.1	2.209
<i>lmo1799</i>	1.8	3.689	<i>lmo2396</i>	1.8	2.611
<i>lmo1800</i>	3.8	2.784	<i>lmo2407</i>	6.0	2.480
<i>rncS</i>	2.3	3.622	<i>lmo2410</i>	5.2	2.254
<i>fabG</i>	2.4	2.342	<i>lmo2435</i>	5.2	3.058
<i>plsX</i>	2.4	4.620	<i>lmo2443</i>	6.0	2.768
<i>pyrAa</i>	2.3	4.286	<i>lmo2470</i>	1.9	2.413
<i>pyrB</i>	2.3	7.503	<i>lmo2497</i>	1.2	3.504
<i>lmo1841</i>	6.0	2.655	<i>lmo2498</i>	1.2	3.722
<i>lmo1854</i>	5.2	3.401	<i>lmo2504</i>	1.8	3.617
<i>lmo1870</i>	2.6	2.566	<i>ftsX</i>	1.7	2.211
<i>lmo1918</i>	5.2	3.594	<i>spl</i>	1.1	2.916
<i>lmo1944</i>	1.4	2.570	<i>lmo2522</i>	1.1	2.203
<i>fhuB</i>	1.2	2.448	<i>lmo2523</i>	3.1	2.827
<i>lmo1959</i>	1.2	2.414	<i>pyrG</i>	2.3	5.324
<i>lmo2012</i>	5.2	2.101	<i>lmo2591</i>	1.8	2.034
<i>lmo2022</i>	2.5	2.694	<i>lmo2595</i>	5.2	2.884
<i>nadC</i>	2.5	4.523	<i>rpsI</i>	3.7.1	2.133
<i>lmo2027</i>	1.9	2.604	<i>rplM</i>	3.7.1	2.850
<i>lmo2048</i>	5.2	3.442	<i>truA</i>	3.6	4.736
<i>lmo2087</i>	5.2	4.802	<i>rpmJ</i>	3.7.1	2.044
<i>lmo2093</i>	6.0	2.424	<i>secY</i>	1.6	2.453
<i>lmo2112</i>	6.0	2.962	<i>rpsE</i>	3.7.1	2.346
<i>lmo2114</i>	1.2	2.582	<i>rplV</i>	3.7.1	2.276
<i>lmo2115</i>	1.2	2.958	<i>rplB</i>	3.7.1	3.555
<i>lmo2131</i>	5.1	3.023	<i>rplW</i>	3.7.1	2.245
<i>lmo2150</i>	5.1	2.651	<i>rplD</i>	3.7.1	3.124
<i>lmo2151</i>	5.2	3.664	<i>rplC</i>	3.7.1	3.307
<i>lmo2156</i>	5.1	2.373	<i>tufA</i>	3.7.4	2.064
<i>lmo2179</i>	1.8	2.505	<i>fusA</i>	3.7.4	2.440
<i>lmo2180</i>	5.2	2.662	<i>rpsG</i>	3.7.1	2.875
<i>lmo2182</i>	1.2	2.694	<i>rpsL</i>	3.7.1	2.334
<i>lmo2184</i>	1.2	2.547	<i>lmo2686</i>	6.0	2.186
<i>lmo2186</i>	1.8	2.295	<i>lmo2711</i>	6.0	5.460
<i>lmo2187</i>	5.1	2.810	<i>cydA</i>	1.4	2.479

<i>lmo2719</i>	5.2	2.213	2876776-	
<i>lmo2720</i>	2.1.1	3.947	2876946	3.965
<i>lmo2725</i>	5.2	3.736	31997-32107	2.415
<i>lmo2726</i>	3.5.2	4.119	357516-357618	2.731
<i>lmo2744</i>	3.5.2	3.263	434831-434929	2.812
<i>lmo2774</i>	1.2	3.352	507206-507394	3.364
<i>lmo2775</i>	1.2	2.843	507450-507643	2.742
<i>lmo2776</i>	6.0	2.824	513584-513807	2.475
<i>lmo2777</i>	1.2	2.324	552327-552421	2.423
<i>lmo2778</i>	6.0	2.730	597812-597926	2.610
<i>bvrC</i>	5.2	3.178	600604-600750	2.334
<i>lmo2809</i>	5.1	2.120	708326-708860	2.501
<i>lmo2812</i>	1.1	2.139	855393-855495	2.642
<i>lmo2813</i>	6.0	2.110	859444-859527	2.261
<i>rpmH</i>	3.7.1	3.554	907576-907832	2.395
1152549-			955829-956001	2.358
1152917		2.495	^(a) Bold entries form an operon, ^(b)	
1179807-			Coordinates indicate position of intergenic	
1179993		2.116	region on the <i>L. monocytogenes</i> genome-	
1180826-			wide transcription start site (TSS) map	
1181254		2.195	(Wurtzel <i>et al.</i> , 2012).	
1198107-				
1198389		2.686		
1199859-				
1199958		2.624		
1266565-				
1267114		2.381		
1275547-275810		2.062		
1326809-				
1326878		2.889		
1359202-				
1359529		2.571		
1584586-				
1584808		2.575		
1702373-				
1702553		2.464		
172171-172268		2.677		
1861377-				
1861630		2.190		
1873621-				
1873763		2.265		
2039087-				
2039375		2.154		
2054124-				
2054308		2.613		
2106073-				
2106292		2.567		
2154775-				
2154852		2.440		
2275258-				
2275363		2.616		
2361274-				
2361423		2.571		
2555928-				
2556012		2.126		
2783098-				
2783274		3.483		
2841962-				
2842200		2.437		

Table S4. List of entries highly expressed (> 9 logarithm) with over 3 fold change transcript level specifically in the $\Delta agrA$ mutant in biotic soil extract.

Name or location ^(a)	Functional category	Fold change			
Entries with a significant higher transcript level			<i>tagB</i>	1.1	3.039
<i>lmo0021</i>	1.2	4.465	<i>lmo1302</i>	3.5.2	5.739
<i>lmo0067</i>	3.8	3.004	<i>lmo1303</i>	5.2	4.645
<i>lmo0109</i>	3.5.2	3.425	<i>lmo1332</i>	5.2	3.294
<i>lmaD</i>	4.5	11.629	<i>lmo1349</i>	2.2	3.426
<i>lmo0133</i>	5.2	7.618	<i>lmo1503</i>	5.2	3.426
<i>lmo0161</i>	5.2	5.034	<i>dnaI</i>	3.1	4.002
<i>lmo0181</i>	1.2	5.382	<i>lmo1621</i>	3.2	3.008
<i>ksgA</i>	3.6	6.070	<i>lmo1704</i>	5.2	3.688
<i>lmo0230</i>	5.2	3.177	<i>lmo1727</i>	3.5.2	4.388
<i>lmo0261</i>	2.1.1	3.242	<i>lmo1729</i>	2.1.1	3.260
<i>lmo0271</i>	2.1.1	4.010	<i>lmo1739</i>	1.2	6.265
<i>lmo0278</i>	1.2	5.941	<i>lmo1789</i>	1.4	5.159
<i>lmo0282</i>	5.2	5.232	<i>lmo1794</i>	5.2	3.411
<i>lmo0298</i>	1.2	6.397	<i>lmo1913</i>	5.2	3.358
<i>lmo0300</i>	2.1.1	4.067	<i>lmo1920</i>	5.2	4.197
<i>lmo0346</i>	2.1.2	4.848	<i>recS</i>	3.3	3.190
<i>lmo0347</i>	2.1.1	13.554	<i>lmo1996</i>	3.5.2	3.984
<i>lmo0348</i>	2.1.1	9.578	<i>lmo1999</i>	2.1.1	7.413
<i>lmo0349</i>	5.1	21.357	<i>lmo2004</i>	3.5.2	4.034
<i>lmo0351</i>	5.2	3.195	<i>lmo2028</i>	5.2	3.198
<i>lmo0384</i>	2.1.1	7.037	<i>lmo2066</i>	6.0	5.771
<i>lmo0391</i>	6.0	4.311	<i>lmo2110</i>	2.1.1	10.020
<i>lmo0399</i>	1.2	3.384	<i>lmo2123</i>	1.2	8.698
<i>lmo0405</i>	1.2	3.756	<i>lmo2124</i>	1.2	13.332
<i>lmo0426</i>	1.2	4.797	<i>lmo2125</i>	1.2	7.342
<i>lmo0492</i>	3.5.2	3.152	<i>lmo2143</i>	2.1.1	3.656
<i>lmo0512</i>	6.0	4.229	<i>lmo2159</i>	1.4	9.932
<i>lmo0517</i>	2.1.2	4.778	<i>lmo2216</i>	5.2	3.130
<i>lmo0536</i>	2.1.1	4.211	<i>lmo2221</i>	5.2	4.669
<i>lmo0553</i>	5.2	3.568	<i>lmo2222</i>	5.2	3.298
<i>hisG</i>	2.2	3.898	<i>lmo2259</i>	1.2	3.239
<i>lmo0596</i>	5.2	3.908	<i>lmo2265</i>	5.2	3.245
<i>lmo0612</i>	3.5.2	5.053	<i>lmo2274</i>	4.3	4.976
<i>lmo0628</i>	5.1	3.051	<i>lmo2302</i>	6.0	3.658
<i>lmo0629</i>	5.2	5.201	<i>lmo2320</i>	6.0	3.066
<i>lmo0667</i>	1.2	4.137	<i>lmo2321</i>		3.840
<i>lmo0674</i>	6.0	3.020	<i>lmo2327</i>	6.0	3.733
<i>lmo0734</i>	3.5.2	3.859	<i>lmo2328</i>	3.5.2	4.647
<i>lmo0762</i>	4.5	4.009	<i>lmo2330</i>	4.3	3.271
<i>lmo0869</i>	5.2	4.556	<i>lmo2344</i>	5.2	3.779
<i>lmo0914</i>	1.2	6.621	<i>lmo2387</i>	5.2	3.905
<i>lmo0917</i>	2.1.1	3.155	<i>lmo2405</i>	5.2	5.774
<i>lmo0993</i>	1.2	5.068	<i>lmo2425</i>	2.2	5.005
<i>lmo0994</i>	5.2	4.331	<i>lmo2432</i>	6.0	3.883
<i>clpE</i>	4.1	4.808	<i>galE</i>	2.1.1	3.448
<i>lmo1006</i>	2.2	4.417	<i>lmo2571</i>	2.5	4.284
<i>lmo1057</i>	2.1.1	4.705	<i>lmo2572</i>	2.5	4.404
<i>lmo1058</i>	5.2	3.378	<i>lmo2583</i>	3.5.2	3.153
			<i>lmo2651</i>	1.2	4.294
			<i>lmo2660</i>	2.1.1	3.241
			<i>lmo2663</i>	2.1.1	3.611
			<i>lmo2665</i>	1.2	18.030

Informations Supplémentaires

<i>lmo2666</i>	1.2	6.938	1663983-	
<i>lmo2668</i>	3.5.2	4.185	1664056	15.850
<i>lmo2674</i>	2.1.1	3.467	1674-1866	3.109
<i>lmo2675</i>	6.0	4.544	167944-168004	3.654
<i>lmo2679</i>	1.3	3.070	1680561-	
<i>lmo2683</i>	1.2	6.686	1680643	4.142
<i>lmo2701</i>	5.2	3.087	1698654-	
<i>lmo2706</i>	6.0	4.390	1698733	8.480
<i>lmo2707</i>	6.0	5.378	1748710-	
<i>lmo2713</i>	1.8	3.772	1748791	3.731
<i>lmo2714</i>	1.8	5.316	1752941-	
<i>lmo2733</i>	1.2	6.300	1753094	4.423
<i>lmo2739</i>	3.5.2	7.523	1767295-	
<i>lmo2762</i>	1.2	5.860	1767358	4.746
<i>lmo2773</i>	3.5.2	7.546	1767740-	
<i>lmo2780</i>	1.2	8.010	1767845	3.154
<i>lmo2781</i>	2.1.1	5.367	1781127-	
<i>lmo2782</i>	1.2	15.507	1781195	4.775
<i>lmo2800</i>	2.1.1	4.361	1998038-	
<i>lmo2801</i>	2.1.1	3.331	1998167	4.855
<i>lmo2824</i>	2.1.1	8.448	2004312-	
1040625-			2004514	3.378
1040671		4.446	2020298-	
1092055-			2020737	3.874
1092254		3.894	2067757-	
1121023-			2067886	6.272
1121097		4.282	2069649-	
1159831-			2069709	12.004
1160219		5.277	2100752-	
122521-122797		3.362	2100844	3.875
1259450-			2110786-	
1259529		8.720	2110908	5.929
1331348-			2113668-	
1331438		3.374	2113733	3.054
1346847-			2207017-	
1346950		5.187	2207102	4.508
1386816-			2208363-	
1387013		3.331	2208575	6.728
1405860-			2225945-	
1405944		8.020	2226532	3.457
1414720-			2236789-	
1415151		3.398	2236843	4.588
1464157-			2242283-	
1464208		3.003	2242375	3.234
1472851-			2341790-	
1472979		3.125	2341864	3.852
1473589-			234338-234413	5.701
1473888		4.109	2348540-	
147765-147883		4.314	2348603	3.812
1502055-			2351301-	
1502251		4.513	2351383	5.461
1505171-			2360185-	
1505311		3.280	2360434	6.345
1561883-			2386681-	
1561977		4.326	2387045	4.775
1564243-			2387664-	
1564342		3.720	2387791	5.094
1600279-			2394985-	
1600355		18.719	2395289	4.911

2395479-		838622-838750	13.146
2395585	7.310		
2396332-		Entries with a significant lower transcript level	
2396453	4.517	<i>lmo0032</i>	6.431
2398085-		<i>lmo0048</i>	4.519
2398286	10.254	<i>lmo0049</i>	3.568
2466626-		<i>lmo0051</i>	9.015
2466712	3.196	<i>lmo0153</i>	4.357
2501151-		<i>plcA</i>	4.020
2501305	11.587	<i>lmo0365</i>	5.917
2506371-		<i>lmo0395</i>	5.203
2506493	4.374	<i>lmo0412</i>	6.220
2536269-		<i>lmo0678</i>	4.673
2536346	5.408	<i>lmo0795</i>	3.454
2549355-		<i>lmo0866</i>	3.999
2549461	3.951	<i>dltD</i>	3.482
2577547-		<i>dltC</i>	4.383
2577695	4.044	<i>dltA</i>	5.171
2590608-		<i>gbuB</i>	5.328
2590801	3.692	<i>lmo1067</i>	4.546
2689324-		<i>lmo1074</i>	3.602
2689441	16.886	<i>lmo1079</i>	4.845
2721490-		<i>glpF</i>	4.049
2721558	5.902	<i>lmo1210</i>	4.093
2740334-		<i>lmo1250</i>	5.276
2740389	12.679	<i>glnR</i>	5.479
2757912-		<i>smbA</i>	3.063
2758045	8.369	<i>lmo1317</i>	3.491
2769274-		<i>pnpA</i>	4.295
2769380	3.789	<i>lmo1431</i>	5.764
2774566-		<i>lmo1582</i>	4.213
2774683	3.057	<i>lmo1617</i>	5.371
280956-281020	4.841	<i>metK</i>	3.026
2843868-		<i>rncS</i>	3.622
2843913	5.371	<i>plsX</i>	4.620
2856283-		<i>pyrAa</i>	4.286
2856378	3.597	<i>pyrB</i>	7.503
290522-290592	3.656	<i>lmo2048</i>	3.442
2917267-		<i>lmo2254</i>	3.295
2917388	4.858	<i>fruA</i>	4.307
2932474-		<i>fruB</i>	6.477
2932608	3.014	<i>lmo2337</i>	4.839
316776-316872	3.826	<i>lmo2352</i>	3.171
324006-324103	10.543	<i>lmo2504</i>	3.617
378320-378403	30.415	<i>pyrG</i>	5.324
396112-396207	7.431	<i>truA</i>	4.736
412364-412456	7.621	<i>rplB</i>	3.555
441571-441621	3.486	<i>rplD</i>	3.124
49307-49584	5.518	<i>rplC</i>	3.307
512209-512290	8.974	<i>lmo2711</i>	5.460
526689-526753	3.069	<i>lmo2720</i>	3.947
551347-551466	3.351	2876776-	
593439-593527	3.826	2876946	3.965
608481-608556	4.180	^(a) Coordinates indicate position of intergenic region on the <i>L. monocytogenes</i> genome-wide transcription start site (TSS) map (Wurtzel <i>et al.</i> , 2012).	
669362-669422	8.048		
680297-680359	9.250		
75229-75341	11.711		
786993-787319	4.516		
788577-788641	3.834		

2. Informations supplémentaires du Chapitre 3

Table S1. Sequences and genotypes targeted by the primers.

Primer	Oligonucleotide sequence 5'→ 3'	Genotype targeted <i>L. monocytogenes</i> :		
		parental	$\Delta agrA$	$\Delta agrD$
C10	CTTCAAACCCGGCATATCAT			
C11	GGAATGTTGGCGAATTTGTT	+	+	+
A19	AATCCATGGTACCGGTTTTTATTTGT			
A20	CTCGAGTAAACTCAAGCTTTTAATTA	+	-	+
B7	AGCTAGCTGTCATGAAGTTTGCTCTCG			
D2	AAGAATCCGCAACTTTCATGG	+	+	-

3. Informations supplémentaires du Chapitre 4

Table S1. Relative abundance of rare genera detected in the constructed microcosms.

Phylum; Class (c); Order (o); Family (f); Genus (g)	Un-diluted	10 ² -diluted	10 ⁴ -diluted
Unique rare genera of the undiluted microcosms			
<i>Acidobacteria</i> ;c <i>Acidobacteria</i> ;o <i>Acidobacteriales</i> ;f <i>Acidobacteriaceae</i> ;Other	0,009%	0,000%	0,000%
<i>Acidobacteria</i> ;c <i>Chloracidobacteria</i> ;o ;f ;g	0,032%	0,000%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Acidimicrobiales</i> ;f <i>Iamiaceae</i> ;Other	0,009%	0,000%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Pseudonocardiaceae</i> ;g	0,019%	0,000%	0,000%
<i>Armatimonadetes</i> ;c <i>S1a-1H</i> ;o ;f ;g	0,009%	0,000%	0,000%
<i>Bacteroidetes</i> ;c <i>Sphingobacteria</i> ;o <i>Sphingobacteriales</i> ;Other;Other	0,027%	0,000%	0,000%
<i>Bacteroidetes</i> ;c <i>Sphingobacteria</i> ;o <i>Sphingobacteriales</i> ;f <i>Flexibacteraceae</i> ;g	0,009%	0,000%	0,000%
<i>Emticicia</i>			
<i>Bacteroidetes</i> ;c <i>Sphingobacteria</i> ;o <i>Sphingobacteriales</i> ;f <i>Flexibacteraceae</i> ;g	0,013%	0,000%	0,000%
<i>Spirosoma</i>			
<i>Chloroflexi</i> ;c <i>Anaerolineae</i> ;Other;Other;Other	0,009%	0,000%	0,000%
<i>Chloroflexi</i> ;c <i>Anaerolineae</i> ;o A4b;f ;g	0,029%	0,000%	0,000%
<i>Chloroflexi</i> ;c <i>Anaerolineae</i> ;o <i>Anaerolineales</i> ;f <i>Anaerolinaceae</i> ;g <i>Anaerolinea</i>	0,035%	0,000%	0,000%
<i>Chloroflexi</i> ;c <i>Anaerolineae</i> ;o GCA004;f ;g	0,014%	0,000%	0,000%
<i>Chloroflexi</i> ;c Bljii12;o AKYG885;f Dolo 23;g	0,040%	0,000%	0,000%
<i>Chloroflexi</i> ;c <i>Chloroflexi</i> ;o <i>Roseiflexales</i> ;f <i>Kouleothrixaceae</i> ;g	0,120%	0,000%	0,000%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Bacilli</i> ;o <i>Bacillales</i> ;f <i>Planococcaceae</i> ;g <i>Viridibacillus</i>	0,018%	0,000%	0,000%
<i>Gemmatimonadetes</i> ;c <i>Gemmatimonadetes</i> ;o <i>Gemmatimonadales</i> ;f <i>Gemmatimonadaceae</i> ;g	0,047%	0,000%	0,000%
<i>Gemmatimonadetes</i> ;c <i>Gemmatimonadetes</i> ;o <i>Gemmatimonadales</i> ;f <i>Gemmatimonadaceae</i> ;g <i>Gemmatimonas</i>	0,009%	0,000%	0,000%
<i>Nitrospirae</i> ;c <i>Nitrospira</i> ;o <i>Nitrospirales</i> ;f FW;g 4-29	0,029%	0,000%	0,000%
<i>Planctomycetes</i> ;c agg27;o CL500-15;f ;g	0,019%	0,000%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Betaproteobacteria</i> ;o <i>Burkholderiales</i> ;f <i>Burkholderiaceae</i> ;Other	0,040%	0,000%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Betaproteobacteria</i> ;o <i>Nitrosomonadales</i> ;f <i>Nitrosomonadaceae</i> ;Other	0,009%	0,000%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Betaproteobacteria</i> ;o <i>Nitrosomonadales</i> ;f <i>Nitrosomonadaceae</i> ;g <i>Nitrosomonas</i>	0,329%	0,000%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Betaproteobacteria</i> ;o <i>Rhodocyclales</i> ;f <i>Rhodocyclaceae</i> ;g <i>Dechloromonas</i>	0,019%	0,000%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Deltaproteobacteria</i> ;o <i>Entotheonellales</i> ;f <i>Entotheonellaceae</i> ;g <i>CandidatusEntotheonella</i>	0,023%	0,000%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Gammaproteobacteria</i> ;o <i>Xanthomonadales</i> ;f <i>Xanthomonadaceae</i> ;g <i>Stenotrophomonas</i>	0,036%	0,000%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Gammaproteobacteria</i> ;o <i>Xanthomonadales</i> ;f <i>Xanthomonadaceae</i> ;g <i>Xanthomonas</i>	0,009%	0,000%	0,000%
WS3;c PRR-12;o Sediment-1;f PRR-10;g	0,009%	0,000%	0,000%
Unique rare genera of the 10²-diluted microcosms			
<i>Acidobacteria</i> ;c RB25;o ;f ;g	0,000%	0,003%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Actinosynnemataceae</i> ;Other	0,000%	0,038%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Actinosynnemataceae</i> ;g <i>Lentzea</i>	0,000%	0,003%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Cryptosporangiaceae</i> ;g	0,000%	0,003%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Intrasporangiaceae</i> ;g	0,000%	0,009%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Intrasporangiaceae</i> ;g <i>Knoellia</i>	0,000%	0,007%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Micromonosporaceae</i> ;g <i>Catellatospora</i>	0,000%	0,005%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Nocardiaceae</i> ;g <i>Skermania</i>	0,000%	0,003%	0,000%

<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Pseudonocardiaceae</i> ;g <i>Actinomycetospora</i>	0,000%	0,003%	0,000%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Thermomonosporaceae</i> ;Other <i>Bacteroidetes</i> ;c <i>Flavobacteria</i> ;o <i>Flavobacteriales</i> ;f <i>Cryomorphaceae</i> ;g <i>Chlorobi</i> ;c SM1B09;o ;f ;g	0,000%	0,016%	0,000%
<i>Chloroflexi</i> ;Other;Other;Other;Other	0,000%	0,005%	0,000%
<i>Chloroflexi</i> ;c RA13C7;o ;f ;g	0,000%	0,008%	0,000%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Bacilli</i> ;o <i>Bacillales</i> ;f <i>Paenibacillaceae</i> ;g	0,000%	0,006%	0,000%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Bacilli</i> ;o <i>Bacillales</i> ;f <i>Thermoactinomycetaceae</i> ;g	0,000%	0,008%	0,000%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Bacilli</i> ;o <i>Bacillales</i> ;f <i>Thermoactinomycetaceae</i> ;g <i>Mechercharimyces</i>	0,000%	0,003%	0,000%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Clostridiales</i> FamilyXIII,IncertaineSedis;g <i>Eubacterium</i>	0,000%	0,021%	0,000%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Eubacteriaceae</i> ;g	0,000%	0,005%	0,000%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Peptococcaceae</i> ;g <i>Dehalobacter</i>	0,000%	0,003%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Alphaproteobacteria</i> ;o <i>Caulobacteriales</i> ;f <i>Caulobacteraceae</i> ;g	0,000%	0,006%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Alphaproteobacteria</i> ;o <i>Rhizobiales</i> ;f <i>Rhizobiaceae</i> ;g	0,000%	0,005%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Alphaproteobacteria</i> ;o <i>Rhizobiales</i> ;f <i>Xanthobacteraceae</i> ;Other <i>Proteobacteria</i> ;c <i>Alphaproteobacteria</i> ;o <i>Rhodospirillales</i> ;f <i>Acetobacteraceae</i> ;g <i>Roseomonas</i>	0,000%	0,003%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Gammaproteobacteria</i> ;o <i>Chromatiales</i> ;f ;Other	0,000%	0,009%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Gammaproteobacteria</i> ;o <i>Legionellales</i> ;f <i>Coxiellaceae</i> ;g <i>Rickettsiella</i>	0,000%	0,008%	0,000%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Gammaproteobacteria</i> ;o <i>Pseudomonadales</i> ;f <i>Moraxellaceae</i> ;Other WS3;c PRR-12;o ;f ;g	0,000%	0,003%	0,000%
	0,000%	0,008%	0,000%

Unique rare genera of the 10⁴-diluted microcosms

<i>Acidobacteria</i> ;c iii1-8;o SJA-36;f ;g	0,000%	0,000%	0,011%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Catenulisporaceae</i> ;g <i>Catenulispora</i>	0,000%	0,000%	0,007%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Frankiaceae</i> ;g	0,000%	0,000%	0,008%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Microbacteriaceae</i> ;g	0,000%	0,000%	0,010%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Propionibacteriaceae</i> ;Other <i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Thermomonosporaceae</i> ;g <i>Actinoallomurus</i>	0,000%	0,000%	0,006%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Thermomonosporaceae</i> ;g <i>Actinocorallia</i>	0,000%	0,000%	0,008%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Rubrobacteriales</i> ;f <i>Rubrobacteraceae</i> ;g	0,000%	0,000%	0,016%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Solirubrobacteriales</i> ;f <i>Solirubrobacteraceae</i> ;Other <i>Bacteroidetes</i> ;c <i>Sphingobacteria</i> ;o <i>Sphingobacteriales</i> ;f <i>Sphingobacteriaceae</i> ;Other <i>Chloroflexi</i> ;c <i>Anaerolineae</i> ;o <i>Anaerolineales</i> ;f <i>Anaerolinaceae</i> ;Other	0,000%	0,000%	0,007%
<i>Chloroflexi</i> ;c <i>Chloroflexi</i> ;o <i>Herpetosiphonales</i> ;f <i>Herpetosiphonaceae</i> ;g <i>Herpetosiphon</i>	0,000%	0,000%	0,015%
<i>Crenarchaeota</i> ;c <i>Thaumarchaeota</i> ;Other;Other;Other	0,000%	0,000%	0,106%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f ;g	0,000%	0,000%	0,009%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Clostridiales</i> FamilyXI,IncertaineSedis;g <i>Soehngenia</i>	0,000%	0,000%	0,006%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Lachnospiraceae</i> ;g <i>Ruminococcus</i>	0,000%	0,000%	0,006%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Symbiobacteriaceae</i> ;g	0,000%	0,000%	0,015%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Halanaerobiales</i> ;f <i>Halanaerobiaceae</i> ;Other	0,000%	0,000%	0,008%
<i>Nitrospirae</i> ;c <i>Nitrospira</i> ;o <i>Nitrospirales</i> ;f <i>Thermodesulfobacteriaceae</i> ;Other	0,000%	0,000%	0,006%
<i>Planctomycetes</i> ;c <i>Planctomyces</i> ;o <i>Gemmatales</i> ;f <i>Gemmataceae</i> ;g	0,000%	0,000%	0,006%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Alphaproteobacteria</i> ;o <i>Rhizobiales</i> ;f <i>Beijerinckiaceae</i> ;g <i>Beijerinckia</i>	0,000%	0,000%	0,027%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Deltaproteobacteria</i> ;o <i>Desulfuromonadales</i> ;f <i>Desulfuromonadaceae</i> ;g <i>Desulfuromonas</i>	0,000%	0,000%	0,009%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Deltaproteobacteria</i> ;o <i>Myxococcales</i> ;f <i>Polyangiaceae</i> ;Other	0,000%	0,000%	0,021%

Informations Supplémentaires

<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales;f Polyangiaceae;g Sorangium</i>	0,000%	0,000%	0,008%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Legionellales;f Coxiellaceae;g</i>	0,000%	0,000%	0,010%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Oceanospirillales;f HTCC2089;g</i>	0,000%	0,000%	0,007%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Sinobacteraceae;g Hydrocarboniphaga</i>	0,000%	0,000%	0,007%
<i>Spirochaetes;c Spirochaetes;o Spirochaetales;f Spirochaetaceae;Other</i>	0,000%	0,000%	0,007%
<i>Tenericutes;c Erysipelotrichi;o Erysipelotrichales;f Erysipelotrichaceae;g Clostridium</i>	0,000%	0,000%	0,007%
<i>Tenericutes;c Mollicutes;o Entomoplasmatales;f Entomoplasmataceae;Other</i>	0,000%	0,000%	0,007%
<i>Tenericutes;c Mollicutes;o RF39;f ;g</i>	0,000%	0,000%	0,006%
<i>WS3;c PRR-12;o Sediment-1;f ;g</i>	0,000%	0,000%	0,006%
Rare genera shared between the undiluted and the 10²-diluted microcosms			
<i>Acidobacteria;Other;Other;Other;Other</i>	0,004%	0,004%	0,000%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micromonosporaceae;g Verrucosipora</i>	0,075%	0,022%	0,000%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Nocardiodaceae;g Aeromicrobium</i>	0,023%	0,008%	0,000%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Streptosporangiaceae;g</i>	0,031%	0,037%	0,000%
<i>Bacteroidetes;Other;Other;Other;Other</i>	0,009%	0,040%	0,000%
<i>Bacteroidetes;c Flavobacteria;o Flavobacteriales;f Flavobacteriaceae;Other</i>	0,004%	0,006%	0,000%
<i>Bacteroidetes;c Sphingobacteria;o Sphingobacteriales;f ;g Niastella</i>	0,084%	0,029%	0,000%
<i>Bacteroidetes;c Sphingobacteria;o Sphingobacteriales;f Flexibacteraceae;g Dyadobacter</i>	0,256%	0,090%	0,000%
<i>Bacteroidetes;c Sphingobacteria;o Sphingobacteriales;f Sphingobacteriaceae;g</i>	0,148%	0,010%	0,000%
<i>Bacteroidetes;c Sphingobacteria;o Sphingobacteriales;f Sphingobacteriaceae;g Sphingobacterium</i>	0,009%	0,014%	0,000%
<i>Chloroflexi;c Thermomicrobia;o Thermomicrobiales;f ;g</i>	0,019%	0,002%	0,000%
<i>Planctomycetes;c Planctomycea;o Gemmatales;f Gemmataceae;g Gemmata</i>	0,004%	0,008%	0,000%
<i>Planctomycetes;c Planctomycea;o Gemmatales;f Isosphaeraceae;g</i>	0,349%	0,119%	0,000%
<i>Planctomycetes;c Planctomycea;o Gemmatales;f Isosphaeraceae;g Singulisphaera</i>	0,806%	0,097%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Caulobacteriales;f Caulobacteraceae;g Asticcacaulis</i>	0,004%	0,009%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f ;g</i>	0,067%	0,011%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Bradyrhizobiaceae;g</i>	0,013%	0,017%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Brucellaceae;g Brucella</i>	0,048%	0,020%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f ;g</i>	0,010%	0,012%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;Other</i>	0,048%	0,005%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Burkholderiaceae;g Cupriavidus</i>	0,038%	0,004%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Comamonadaceae;g Xenophilus</i>	0,028%	0,026%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Oxalobacteraceae;g</i>	0,004%	0,018%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales;f Cystobacteraceae;g Stigmatella</i>	0,009%	0,007%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Chromatiales;Other;Other</i>	0,023%	0,003%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Oceanospirillales;f 211ds20;g</i>	0,010%	0,004%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f Moraxellaceae;g Acinetobacter</i>	0,113%	0,041%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g Dokdonella</i>	0,058%	0,014%	0,000%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g Frateuria</i>	0,018%	0,003%	0,000%
<i>Verrucomicrobia;c Opitutae;o Opitutales;f Opitutaceae;g</i>	0,009%	0,004%	0,000%

<i>Verrucomicrobia</i> ;c <i>Opiritutae</i> ;o <i>Opiritutales</i> ;f <i>Opiritutaceae</i> ;g <i>Opiritutus</i>	0,013%	0,002%	0,000%
Rare genera shared between the undiluted and the 10⁴-diluted microcosms			
<i>Acidobacteria</i> ;c Sva0725;o Sva0725;f ;g	0,004%	0,000%	0,004%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Acidimicrobiales</i> ;f CL500-29;g	0,019%	0,000%	0,035%
CCM11b;c ;o ;f ;g	0,009%	0,000%	0,004%
<i>Chlorobi</i> ;c SJA-28;o ;f ;g	0,013%	0,000%	0,039%
<i>Chloroflexi</i> ;c Bljii12;o B07 WMSP1;f FFCH4570;g	0,010%	0,000%	0,004%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Betaproteobacteria</i> ;o <i>Burkholderiales</i> ;f <i>Alcaligenaceae</i> ;Other	0,004%	0,000%	0,085%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Betaproteobacteria</i> ;o <i>Nitrosomonadales</i> ;f <i>Nitrosomonadaceae</i> ;g			
<i>Nitrosospora</i>	0,263%	0,000%	0,006%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Betaproteobacteria</i> ;o <i>Rhodocyclales</i> ;f <i>Rhodocyclaceae</i> ;g			
<i>Methyloversatilis</i>	0,010%	0,000%	0,003%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Deltaproteobacteria</i> ;o <i>Myxococcales</i> ;f <i>Cystobacteraceae</i> ;g	0,040%	0,000%	0,011%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Gammaproteobacteria</i> ;o <i>Pseudomonadales</i> ;f			
<i>Pseudomonadaceae</i> ;g <i>Azotobacter</i>	0,009%	0,000%	0,003%
Rare genera shared between the 10²-diluted and the 10⁴-diluted microcosms			
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Frankiaceae</i> ;Other	0,000%	0,012%	0,003%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Kineosporiaceae</i> ;g	0,000%	0,005%	0,018%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Micrococcaceae</i> ;Other	0,000%	0,014%	0,175%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Nocardiaceae</i> ;Other	0,000%	0,025%	0,018%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Promicromonosporaceae</i> ;Other	0,000%	0,007%	0,009%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Actinomycetales</i> ;f <i>Streptosporangiaceae</i> ;g			
<i>Microbispora</i>	0,000%	0,003%	0,015%
<i>Actinobacteria</i> ;c <i>Actinobacteria</i> ;o <i>Solirubrobacterales</i> ;f <i>Patulibacteraceae</i> ;g	0,000%	0,002%	0,011%
<i>Cyanobacteria</i> ;c <i>Chloroplast</i> ;o <i>Chlorophyta</i> ;f <i>Trebouxiophyceae</i> ;g	0,000%	0,004%	0,037%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Bacilli</i> ;o <i>Bacillales</i> ;f <i>Bacillaceae</i> ;g <i>Geobacillus</i>	0,000%	0,004%	0,004%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Bacilli</i> ;o <i>Haloplasmatales</i> ;f <i>Haloplasmataceae</i> ;g	0,000%	0,038%	0,027%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Bacilli</i> ;o <i>Turicibacterales</i> ;f <i>Turicibacteraceae</i> ;g <i>Turicibacter</i>	0,000%	0,004%	0,003%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Catabacteriaceae</i> ;g	0,000%	0,004%	0,008%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Clostridiaceae</i> ;g	0,000%	0,005%	0,007%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>ClostridialesFamilyXI,IncertaineSedis</i> ;g			
<i>Sedimentibacter</i>	0,000%	0,003%	0,019%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>ClostridialesFamilyXI,IncertaineSedis</i> ;g			
<i>Tissierella</i>	0,000%	0,006%	0,035%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f			
<i>ClostridialesFamilyXIII,IncertaineSedis</i> ;Other	0,000%	0,003%	0,025%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Lachnospiraceae</i> ;g	0,000%	0,009%	0,007%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Lachnospiraceae</i> ;g <i>Clostridium</i>	0,000%	0,008%	0,008%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Lachnospiraceae</i> ;g <i>Epulopiscium</i>	0,000%	0,008%	0,032%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Peptococcaceae</i> ;Other	0,000%	0,022%	0,083%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Peptococcaceae</i> ;g	0,000%	0,009%	0,007%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Ruminococcaceae</i> ;Other	0,000%	0,006%	0,033%
<i>Firmicutes</i> ;c <i>Clostridia</i> ;o <i>Clostridiales</i> ;f <i>Veillonellaceae</i> ;g <i>Thermosinus</i>	0,000%	0,004%	0,004%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Alphaproteobacteria</i> ;o <i>Rhizobiales</i> ;f <i>Methylocystaceae</i> ;g			
<i>Methylosinus</i>	0,000%	0,005%	0,017%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Alphaproteobacteria</i> ;o <i>Sphingomonadales</i> ;f <i>Sphingomonadaceae</i> ;g	0,000%	0,004%	0,008%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Deltaproteobacteria</i> ;o <i>Myxococcales</i> ;f <i>Haliangiaceae</i> ;Other	0,000%	0,004%	0,021%
<i>Proteobacteria</i> ;c <i>Gammaproteobacteria</i> ;o <i>Legionellales</i> ;f <i>Coxiellaceae</i> ;g <i>Aquicella</i>	0,000%	0,023%	0,039%
SC3;c ;o ;f ;g	0,000%	0,002%	0,004%
TM6;c SBRH58;o ;f ;g	0,000%	0,007%	0,011%
TM6;c SJA-4;o ;f ;g	0,000%	0,010%	0,014%
WS3;c PRR-12;o LD1-PA13;f ;g	0,000%	0,005%	0,011%
Rare genera detected in all microcosms			

Informations Supplémentaires

<i>Acidobacteria;c ;o ;f ;g</i>	0,067%	0,005%	0,023%
<i>Acidobacteria;c ;o ;f Koribacteraceae;Other</i>	0,014%	0,018%	0,018%
<i>Acidobacteria;c ;o ;f Koribacteraceae;g CandidatusKoribacter</i>	0,081%	0,010%	0,014%
<i>Acidobacteria;c Acidobacteria;o Acidobacteriales;f ;g</i>	0,606%	0,110%	0,033%
<i>Acidobacteria;c Acidobacteria;o Acidobacteriales;f Acidobacteriaceae;g Edaphobacter</i>	0,167%	0,217%	0,004%
<i>Acidobacteria;c iii1-8;o 32-20;f ;g</i>	0,206%	0,165%	0,391%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o ;f ;g</i>	0,018%	0,017%	0,037%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Acidimicrobiales;Other;Other</i>	0,152%	0,055%	0,293%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Acidimicrobiales;f ;g</i>	0,019%	0,010%	0,038%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Acidimicrobiales;f AKIW874;g</i>	0,004%	0,017%	0,050%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Acidimicrobiales;f EB1017;g</i>	0,121%	0,355%	0,581%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Acidimicrobiales;f Iamiaceae;g</i>	0,036%	0,043%	0,131%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Acidimicrobiales;f Iamiaceae;g Iamia</i>	0,047%	0,004%	0,051%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Actinosynnemataceae;g</i>	0,027%	0,278%	0,059%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Intrasporangiaceae;Other</i>	0,064%	0,010%	0,024%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Intrasporangiaceae;g Phycococcus</i>	0,023%	0,035%	0,074%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Intrasporangiaceae;g Terracoccus</i>	0,621%	0,422%	0,474%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Microbacteriaceae;g Frigoribacterium</i>	0,009%	0,005%	0,003%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Microbacteriaceae;g Microbacterium</i>	0,027%	0,007%	0,004%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micrococcaceae;g Arthrobacter</i>	0,013%	0,012%	0,068%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micromonosporaceae;Other</i>	0,235%	0,285%	0,152%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micromonosporaceae;g Micromonospora</i>	0,296%	0,345%	0,143%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Mycobacteriaceae;g Mycobacterium</i>	0,036%	0,029%	0,082%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Nocardiaceae;g Rhodococcus</i>	0,396%	0,292%	0,312%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Nocardiodaceae;Other</i>	0,556%	0,411%	0,403%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Nocardiodaceae;g</i>	0,019%	0,065%	0,079%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Nocardiodaceae;g Actinopolymorpha</i>	0,056%	0,147%	0,022%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Nocardiodaceae;g Marmoricola</i>	0,229%	0,261%	0,246%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Nocardiodaceae;g Pimelobacter</i>	0,013%	0,006%	0,003%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Promicromonosporaceae;g Promicromonospora</i>	0,434%	0,405%	0,112%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Propionibacteriaceae;g</i>	0,010%	0,011%	0,007%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Pseudonocardiaceae;Other</i>	0,014%	0,003%	0,006%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Pseudonocardiaceae;g Amycolatopsis</i>	0,019%	0,131%	0,083%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Pseudonocardiaceae;g Pseudonocardia</i>	0,125%	0,113%	0,179%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Pseudonocardiaceae;g Saccharomonospora</i>	0,018%	0,003%	0,011%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Pseudonocardiaceae;g Saccharopolyspora</i>	0,170%	0,581%	0,039%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Streptomycetaceae;g Kitasatospora</i>	0,036%	0,142%	0,072%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Streptosporangiaceae;g Nonomuraea</i>	0,027%	0,107%	0,033%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Streptosporangiaceae;g</i>	0,009%	0,047%	0,007%

Streptosporangium

<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Thermomonosporaceae;g Actinomadura</i>	0,069%	0,136%	0,014%
<i>Actinobacteria;c Actinobacteria;o Solirubrobacterales;f Solirubrobacteraceae;g Armatimonadetes;c SJA-176;o ;f ;g</i>	0,019%	0,019%	0,014%
<i>Bacteroidetes;c Flavobacteria;o Flavobacteriales;f Flavobacteriaceae;g Flavobacterium</i>	0,004%	0,004%	0,015%
<i>Bacteroidetes;c Sphingobacteria;o Sphingobacteriales;f ;Other</i>	0,044%	0,019%	0,006%
<i>Bacteroidetes;c Sphingobacteria;o Sphingobacteriales;f ;g Chitinophaga</i>	0,343%	0,115%	0,030%
<i>Bacteroidetes;c Sphingobacteria;o Sphingobacteriales;f ;g Flavisolibacter</i>	0,343%	0,288%	0,460%
<i>Bacteroidetes;c Sphingobacteria;o Sphingobacteriales;f Flexibacteraceae;g Cytophaga</i>	0,073%	0,005%	0,012%
<i>Bacteroidetes;c Sphingobacteria;o Sphingobacteriales;f Sphingobacteriaceae;g Pedobacter</i>	0,324%	0,200%	0,087%
<i>Chloroflexi;c Ktedonobacteria;o ;f ;g</i>	0,715%	0,204%	0,008%
<i>Chloroflexi;c SOGA31;o ;f ;g</i>	0,056%	0,037%	0,031%
<i>Chloroflexi;c TK17;o ;f ;g</i>	0,049%	0,084%	0,079%
<i>Chloroflexi;c Thermomicrobia;o HN1-15;f ;g</i>	0,019%	0,031%	0,013%
<i>Crenarchaeota;c C2;o pGrfC26;f ;g</i>	0,185%	0,061%	0,024%
<i>Crenarchaeota;c Thaumarchaeota;o Nitrososphaerales;f Nitrososphaeraceae;g CandidatusNitrososphaera</i>	0,009%	0,020%	0,034%
<i>Firmicutes;Other;Other;Other;Other</i>	0,046%	0,066%	0,102%
<i>Firmicutes;c Bacilli;Other;Other;Other</i>	0,049%	0,074%	0,213%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Alicyclobacillaceae;g Alicyclobacillus</i>	0,053%	0,031%	0,112%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;Other</i>	0,004%	0,018%	0,046%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Paenibacillaceae;g Ammoniphilus</i>	0,023%	0,065%	0,093%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Paenibacillaceae;g Brevibacillus</i>	0,128%	0,293%	0,517%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Paenibacillaceae;g Cohnella</i>	0,004%	0,008%	0,015%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Paenibacillaceae;g Paenibacillus</i>	0,136%	0,088%	0,145%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Planococcaceae;g</i>	0,520%	0,529%	0,453%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Planococcaceae;g Kurthia</i>	0,093%	0,340%	0,454%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Planococcaceae;g Paenisporosarcina</i>	0,018%	0,016%	0,021%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Planococcaceae;g Rummeliibacillus</i>	0,014%	0,012%	0,007%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Planococcaceae;g Solibacillus</i>	0,018%	0,010%	0,008%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Planococcaceae;g Sporosarcina</i>	0,166%	0,133%	0,397%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Planococcaceae;g Ureibacillus</i>	0,428%	0,494%	0,219%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Thermoactinomycetaceae;Other</i>	0,009%	0,002%	0,026%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Thermoactinomycetaceae;g Shimazuella</i>	0,027%	0,070%	0,100%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Turicibacterales;f Turicibacteraceae;Other</i>	0,179%	0,344%	0,066%
<i>Firmicutes;c Bacilli;o Turicibacterales;f Turicibacteraceae;g</i>	0,069%	0,110%	0,261%
<i>Firmicutes;c Clostridia;Other;Other;Other</i>	0,040%	0,080%	0,173%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f BSV43;g</i>	0,009%	0,031%	0,110%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Clostridiaceae;Other</i>	0,018%	0,003%	0,016%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Clostridiaceae;g Alkaliphilus</i>	0,082%	0,193%	0,427%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Clostridiaceae;g Caloramator</i>	0,022%	0,029%	0,017%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Lachnospiraceae;Other</i>	0,018%	0,044%	0,088%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Lachnospiraceae;g Anaerostipes</i>	0,111%	0,179%	0,349%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Peptococcaceae;g Desulfitobacterium</i>	0,027%	0,137%	0,176%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Peptococcaceae;g Desulfosporosinus</i>	0,065%	0,142%	0,221%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Peptostreptococcaceae;Other</i>	0,128%	0,437%	0,846%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Peptostreptococcaceae;g Tepidibacter</i>	0,031%	0,027%	0,115%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Ruminococcaceae;g</i>	0,027%	0,134%	0,149%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Ruminococcaceae;g Acetivibrio</i>	0,019%	0,011%	0,025%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Ruminococcaceae;g Ruminococcus</i>	0,028%	0,130%	0,221%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Veillonellaceae;Other</i>	0,013%	0,009%	0,011%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Veillonellaceae;g</i>	0,131%	0,260%	0,314%
	0,010%	0,040%	0,100%

Informations Supplémentaires

<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Veillonellaceae;g Desulfosporomusa</i>	0,018%	0,057%	0,047%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Veillonellaceae;g Sporotalea</i>	0,070%	0,158%	0,256%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o Halanaerobiales;f Halanaerobiaceae;g</i>	0,023%	0,070%	0,111%
<i>Firmicutes;c Clostridia;o OPB54;f ;g</i>	0,032%	0,042%	0,102%
<i>Gemmatimonadetes;c Gemmatimonadetes;o Gemmatimonadales;f ;g</i>	0,414%	0,116%	0,231%
<i>Nitrospirae;c Nitrospira;o Nitrospirales;f Nitrospiraceae;g Nitrospira</i>	0,074%	0,026%	0,094%
<i>Nitrospirae;c Nitrospira;o Nitrospirales;f Thermodesulfovibrionaceae;g GOUTA19</i>	0,019%	0,024%	0,023%
<i>Planctomycetes;c Phycisphaerae;o ;f ;g</i>	0,123%	0,005%	0,008%
<i>Planctomycetes;c Planctomycea;o Planctomycetales;f Planctomycetaceae;g</i>			
<i>Planctomyces</i>	0,130%	0,021%	0,003%
<i>Proteobacteria;Other;Other;Other;Other</i>	0,350%	0,173%	0,137%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;Other;Other;Other</i>	0,188%	0,182%	0,110%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o ;f ;g</i>	0,239%	0,107%	0,032%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Caulobacterales;f Caulobacteraceae;Other</i>	0,081%	0,074%	0,003%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Caulobacterales;f Caulobacteraceae;g</i>			
<i>Caulobacter</i>	0,101%	0,144%	0,078%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Caulobacterales;f Caulobacteraceae;g</i>			
<i>Phenylobacterium</i>	0,119%	0,144%	0,099%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f ;Other</i>	0,229%	0,053%	0,036%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f ;g Nordella</i>	0,352%	0,061%	0,021%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Beijerinckiaceae;Other</i>	0,054%	0,025%	0,008%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Beijerinckiaceae;g</i>	0,199%	0,059%	0,053%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Bradyrhizobiaceae;g Afipia</i>	0,370%	0,682%	0,313%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Bradyrhizobiaceae;g</i>			
<i>Balneimonas</i>	0,151%	0,078%	0,026%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Bradyrhizobiaceae;g</i>			
<i>Rhodopseudomonas</i>	0,180%	0,116%	0,008%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Brucellaceae;g</i>			
<i>Ochrobactrum</i>	0,360%	0,327%	0,043%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Hyphomicrobiaceae;Other</i>	0,147%	0,090%	0,138%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Hyphomicrobiaceae;g</i>	0,004%	0,003%	0,006%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Hyphomicrobiaceae;g</i>			
<i>Hyphomicrobium</i>	0,155%	0,210%	0,364%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Hyphomicrobiaceae;g</i>			
<i>Pedomicrobium</i>	0,398%	0,573%	1,105%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Hyphomicrobiaceae;g</i>			
<i>Rhodomicrobium</i>	0,027%	0,029%	0,094%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Phyllobacteriaceae;Other</i>	0,415%	0,287%	0,154%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Phyllobacteriaceae;g</i>	0,041%	0,027%	0,204%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Phyllobacteriaceae;g</i>			
<i>Aminobacter</i>	0,029%	0,023%	0,022%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Rhizobiaceae;g</i>			
<i>Agrobacterium</i>	0,526%	0,263%	0,356%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Rhizobiaceae;g Kaistia</i>	0,168%	0,028%	0,008%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Xanthobacteraceae;g</i>	0,041%	0,022%	0,004%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Xanthobacteraceae;g Labrys</i>	0,368%	0,207%	0,090%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales;f Acetobacteraceae;Other</i>	0,068%	0,091%	0,003%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales;f Acetobacteraceae;g</i>	0,035%	0,002%	0,021%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales;f Rhodospirillaceae;Other</i>	0,023%	0,022%	0,007%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales;f Rhodospirillaceae;g</i>			
<i>Inquilinus</i>	0,032%	0,034%	0,017%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;Other;Other</i>	0,056%	0,030%	0,007%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;g</i>			
<i>Kaistobacter</i>	0,013%	0,016%	0,006%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;g</i>			
<i>Sphingomonas</i>	0,055%	0,009%	0,007%
<i>Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;g</i>	0,036%	0,028%	0,014%

<i>Sphingopyxis</i>			
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;Other;Other;Other</i>	0,118%	0,021%	0,154%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o ;f ;g</i>	0,269%	0,046%	0,094%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;Other;Other</i>	0,625%	0,266%	0,137%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f ;Other</i>	0,102%	0,055%	0,003%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f ;g Methylibium</i>	0,055%	0,025%	0,007%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Alcaligenaceae;g</i>	0,181%	0,012%	0,046%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Alcaligenaceae;g</i>			
<i>Achromobacter</i>	0,054%	0,070%	0,007%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Burkholderiaceae;g</i>			
<i>Burkholderia</i>	0,583%	0,078%	0,080%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Comamonadaceae;g</i>			
<i>Polaromonas</i>	0,292%	0,252%	0,007%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Oxalobacteraceae;Other</i>	0,056%	0,019%	0,008%
<i>Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Rhodocyclales;f ;g</i>	0,294%	0,026%	0,045%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;Other;Other;Other</i>	0,052%	0,021%	0,040%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o ;f ;g</i>	0,004%	0,038%	0,064%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Bdellovibrionales;f Bdellovibrionaceae;g</i>	0,032%	0,029%	0,085%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Desulfuromonadales;f Geobacteraceae;g</i>			
<i>Geobacter</i>	0,026%	0,002%	0,015%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o MIZ46;f ;g</i>	0,013%	0,047%	0,081%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales;Other;Other</i>	0,500%	0,293%	0,365%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales;f ;g</i>	0,244%	0,166%	0,124%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales;f Cystobacteraceae;Other</i>	0,105%	0,054%	0,167%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales;f Haliangiaceae;g</i>	0,366%	0,471%	0,761%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales;f Myxococcaceae;g</i>			
<i>Anaeromyxobacter</i>	0,037%	0,022%	0,128%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales;f Nannocystaceae;g</i>			
<i>Plesiocystis</i>	0,004%	0,002%	0,003%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales;f Polyangiaceae;g</i>	0,070%	0,106%	0,254%
<i>Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o NB1-j;Other;Other</i>	0,010%	0,003%	0,007%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;Other;Other;Other</i>	0,051%	0,032%	0,018%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Chromatiales;f ;g</i>	0,037%	0,008%	0,045%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Chromatiales;f Sinobacteraceae;Other</i>	0,273%	0,078%	0,066%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f</i>			
<i>Pseudomonadaceae;Other</i>	0,027%	0,002%	0,012%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f</i>			
<i>Xanthomonadaceae;Other</i>	0,381%	0,297%	0,047%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g</i>	0,093%	0,062%	0,022%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g</i>			
<i>Lysobacter</i>	0,917%	0,318%	0,011%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g</i>			
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,235%	0,068%	0,063%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g</i>			
<i>Rhodanobacter</i>	0,048%	0,002%	0,101%
<i>Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g</i>			
<i>Thermomonas</i>	0,516%	0,882%	0,119%
<i>SPAM;c 0319-6G9;o ;f ;g</i>	0,009%	0,006%	0,004%
<i>Tenericutes;c ML615J-28;o ;f ;g</i>	0,024%	0,009%	0,044%
<i>Verrucomicrobia;c Spartobacteria;o Spartobacteriales;f Spartobacteriaceae;g</i>			
<i>CandidatusXiphinematobacter</i>	0,023%	0,004%	0,008%
<i>Verrucomicrobia;c Spartobacteria;o Spartobacteriales;f Spartobacteriaceae;g</i>			
<i>Chthoniobacter</i>	0,182%	0,029%	0,007%
<i>Verrucomicrobia;c Spartobacteria;o Spartobacteriales;f Spartobacteriaceae;g</i>			
<i>MC18</i>	0,019%	0,004%	0,004%
<i>WS3;c PRR-12;o Sediment-1;Other;Other</i>	0,048%	0,042%	0,123%